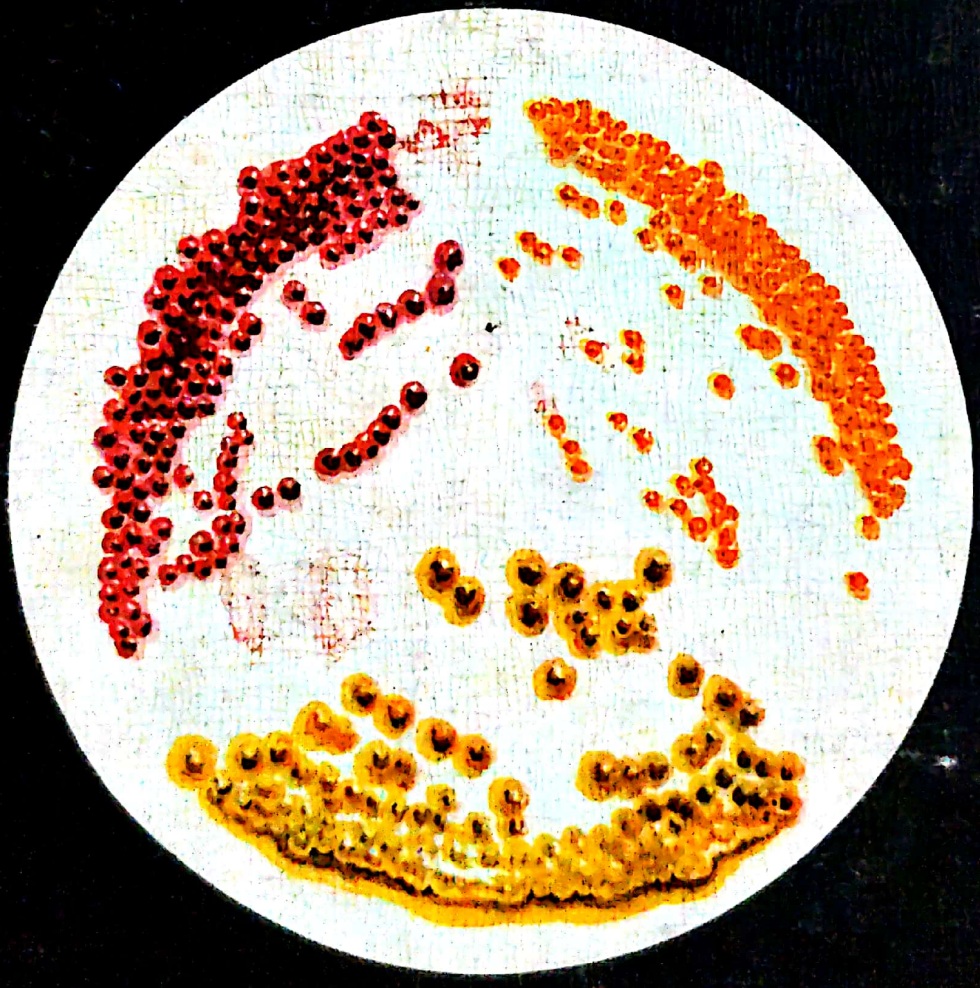
A. IVANOF M. CIUPE C. SAȘCĂ DOINA VANCEA

MICROBIOLOGIE



EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ
București — 1982

Prof. dr. ANTIPA IVANOF

MIRCEA CIUPE
Conf. univ. dr.

CONSTANTIN SAȘCĂ
Șef lucr. dr.

DOINA VANCEA
Șef lucr. dr.

MICROBIOLOGIE

pentru facultățile de medicină

EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ
BUCUREȘTI

Scanned with OKEN Scanner

Lucrarea a fost analizată și aprobată de către colectivul catedrei de microbiologie; conducerea facultății de medicină generală și conducerea I.M.F. Cluj-Napoca.

Redactor: AURORA MIHAIL
Tehnoredactor: OTTO PARASCHIV NECȘOIU

Ilustrația: VIOLETA BERBESCU
MIȘU FILIP
Coperta: VICTOR WEGEMANN

Coli de tipar: 18,75. Format: 16/70×100.
Bun de tipar: 15 X 1982. Ediția: 1982.
Nr. de plan: 9196

Intreprinderea Poligrafică Cluj
B-dul Lenin Nr. 146
Municipiul Cluj-Napoca
Republica Socialistă România
Comanda Nr. 329

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚA

Acumulările neîntrerupte de noi date științifice privitoare la biologia și aplicațiile practice ale cunoașterii microorganismelor ating în prezent dimensiuni de neimaginat în urmă cu 30—40 de ani. În decursul existenței sale, microbiologia a beneficiat și își asigură în continuare suportul conceptual, metodologic, tehnic și faptic prin aportul de neînlocuit al chimiei, biochimiei, fizicii, biofizicii, geneticii, biologiei celulare și moleculare. Practic, oricare din marile succese ale acestor științe s-au răsfrînt asupra studiului microbilor, iar aceștia le servesc în momente cruciale drept excepționale modele experimentale.

Progresul microbiologiei este marcat de continua specializare și ultraspecializare, de restrîngerea, aprofundarea și particularizarea obiectului noilor discipline, subdiscipline, domenii de cercetare și aplicare ce se diferențiază din microbiologie, considerată cu mare dificultate ca un întreg, îndoielnic de cuprins nu de un om, dar nici măcar de instituții sau organisme științifice internaționale.

În același timp se înregistrează un efort, integrator în marea știință microbiologică, ale cărei rezultate potențiale nu pot fi subapreciate.

La nivelul studiilor universitare medicale integrarea într-o singură disciplină a bacteriologiei, virusologiei, parazitologiei, micologiei, a studiului infecției și imunității, ca și a unor capitole conexe, urmărește să asigure într-un spațiu record o reprezentare cît mai apropiată de realitate a ceea ce sînt microbii, ca și a ceea ce fac aceștia în relațiile lor cu oamenii și mediul biotic și abiotic în care trăiesc.

Înțelegem, în acest vast context complex și complicat, cît de dificilă și ingrată este sarcina elaborării unui manual de microbiologie medicală pentru studenți.

Profesorul Antipa Ivanof și colaboratorii săi au reușit, deoarece au ales calea selectării cunoștințelor acumulate după criteriul folosului pe care îl pot avea studenții, viitorii medici, care indiferent de specialitatea ce vor face au nevoie de a asimila bazele microbiologiei medicale. Expunerea sistematică și clară, includerea fără excese a aplicațiilor practice medicale, un efort de a fi moderni în conținut și formă, caracterizează această valoroasă lucrare didactică, pentru care felicit călduros pe autori și mă bucur pentru studenții ce vor învăța cu ajutorul acestui manual.

31 Mai 1982

Prof. dr. VLAD BÎLBÎE
Directorul Institutului I. Cantacuzino

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Capitolul 1. MICROBIOLOGIE GENERALĂ

1.1. LUMEA MICROBIANĂ
Ivanof A., Ciupe M. 9

1.2. MORFOLOGIA ŞI ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A CELULEI BACTERIENE
Ivanof A.
1.2.1. Morfologia bacteriană **11** 1.2.2. Celula bacteriană, celulă de tip procariot **13** 1.2.3. Organizarea ultrastructurală a celulei bacteriene **13**. 1.2.4. Mecanismul coloraţiilor gram şi Ziehl-Neelsen **25**. 1.2.5. Importanţa practică a cunoştinţelor de morfologie bacteriană **25**.

1.3. METABOLISMUL BACTERIAN
Ivanof A.
1.3.1. Diversitatea metabolismului bacterian în unitatea lumii vii **26**. 1.3.2. Catabolism, anabolism, metabolism bioenergetic **29**. 1.3.3. De la catabolism la biosinteza materialului celular **36**. 1.3.4. Creşterea şi multiplicarea bacteriilor. Curba de dezvoltare **39**.

1.4. GENETICA BACTERIANĂ
Saşcă C.
1.4.1. Organizarea şi funcţionarea materialului genetic la bacterii **44**. 1.4.2. Modificarea materialului genetic la bacterii **53**. 1.4.3. Rolul eredităţii extracromozomiale şi evoluţia materialului genetic la bacterii **63**.

1.5. ACŢIUNEA FACTORILOR FIZICI ŞI CHIMICI ASUPRA BACTERIILOR
Saşcă C. 64

1.6. CHIMIOTERAPIA ANTIBACTERIANĂ
Ivanof A.
1.6.1. Familii de chimioterapice **71**. 1.6.2. Mecanismul de acţiune **71**. 1.6.3. Cîştigarea rezistenţei la antibiotice **76**. 1.6.4. Interrelaţii chimioterapie-bacterie-organism gazdă **78**. 1.6.5. Chimioterapice antifungice **80**.

Capitolul 2. INFECŢIE ŞI IMUNITATE

2.1. RELAŢII ECOLOGICE ALE MICROORGANISMELOR. INFECŢIA
Ivanof A.
2.1.1. Relaţii ecologice ale microorganismelor **81**. 2.1.2. Infecţia **82**. 2.1.3. Patogenitate şi virulenţă **84**.

Scanned with OKEN Scanner

2.2. REZISTENȚA NATURALĂ
Vancea Doina
2.2.1. Factorii care asigură rezistența naturală **92.** 2.2.2. Fagocitoza **94.** 2.2.3. Inflamația **98.**

2.3. IMUNITATE ȘI IMUNOLOGIE. SISTEM IMUN. TIPURI DE IMUNITATE
Ivanof A.
2.3.1. Sistemul imun și sistemul limfoid **102.** 2.3.2. Tipurile de imunitate **106.**

2.4. ANTIGEN. IMUNGLOBULINE. COMPLEMENT
Ivanof A., Ciupe M.
2.4.1. Antigenul **108.** 2.4.2. Imunglobulinele **112.** 2.4.3. Complementul **116.**

2.5. INSTALAREA ȘI MODULAREA RĂSPUNSULUI IMUN
Ivanof A.
2.5.1. Participarea limfocitelor în răspunsul imun **123.** 2.5.2. Modularea răspunsului imun prin cooperare celulară **126.** 2.5.3. Modularea răspunsului imun prin antigen **130.**

2.6. MANIFESTĂRILE SISTEMELOR EFECTOARE ALE RĂSPUNSULUI IMUN
Ciupe M.
2.6.1. Manifestări ale imunității umorale **137.** 2.6.2. Manifestări ale efectorilor imunității mediate celular **140.**

2.7. IMUNITATEA CA FUNCȚIE HOMEOSTATICĂ. APĂRAREA ANTIINFECȚIOASĂ. DEVIERI ALE RĂSPUNSULUI IMUN
Ivanof A.
2.7.1. Imunitatea și apărarea antiinfecțioasă **144.** 2.7.2. Aplicații ale manifestărilor efectorilor imunitari în practica medicală **148.** 2.7.3. Imunitatea antitumorală **152.** 2.7.4. Imunitatea de transplant **153.** 2.7.5. Imunitate și imunopatologie **154.**

Capitolul 3. BACTERIOLOGIE SPECIALĂ

3.1. CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE ȘI TOXIINFECȚIA DIFTERICĂ
Ivanof A. **153**

3.2. GENUL MIYCOBACTERIUM ȘI INFECȚIA TUBERCULOASĂ
Sașcă C. **162**

3.3. BACILLUS ANTHRACIS ȘI INFECȚIA CĂRBUNOASĂ
Ciupe M. **168**

3.4. BACTERIILE ANAEROBE ȘI INFECȚIILE PRODUSE DE ANAEROBI
Ciupe M.
3.4.1. Genul Clostridium **169.** 3.4.2. Anaerobii nesporulați **172.**

Scanned with OKEN Scanner

3.5. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE ŞI INFECŢIILE PRODUSE DE ACESTE BACTERII
Ivanof A
3.5.1. Generalităţi **173.** 3.5.2. Genuri cu patogenitate certă: Shigella şi Salmonella **176.** 3.5.3. Enterobacteriile şi enteritele **178** 3.5.4. Participarea bacteriilor comensale şi a altor bacterii gramnegative în patologia umană **179.**

3.6. VIBRIO CHOLERAE ŞI HOLERA
Ciupe M. **181**

3.7. GENUL HAEMOPHYLUS BORDETELLA.
Vancea Doina
3.7.1. Genul Haemophylus **183** 3.7.2. Genul Bordetella **184.**

3.8. GENUL BRUCELLA ŞI BRUCELOZA
Ciupe M **185**

3.9. GENUL STAPHYLOCOCCUS ŞI INFECŢIILE STAFILOCOCICE
Vancea Doina **186**

3.10. GENUL STREPTOCOCCUS ŞI INFECŢIILE STREPTOCOCICE
Saşcă C **191**

3.11. GENUL NEISSERIA ŞI INFECŢIILE PRODUSE
Ciupe M **197**

3.12. FAMILIA SPIROCHETACEAE ŞI ÎMBOLNĂVIRILE PRODUSE
Ciupe M.
3.12.1. Genul Treponema **199.** 3.12.2. Genul Leptospira **201.** 3.12.3. Genul Borrelia **202.**

3.13. GENURILE RICKETTSIA ŞI CHLAMYDIA
Vancea Doina
3.13.1. Rickettsiile **203.** 3.13.2. Genul Chlamydia **206.**

3.14. MYCOPLASMELE
Vancea Doina **208**

Capitolul 4. VIRUSOLOGIE

4.1. PROPRIETĂŢILE GENERALE ALE VIRUSURILOR
Saşcă C.
4.1.1. Compoziţia chimică a virionului **211.** 4.1.2. Arhitectura virionului **213.** 4.1.3. Forma şi dimensiunile virusurilor **214.** 4.1.4. Viroizii **216.**

Scanned with OKEN Scanner

4.2. CLASIFICAREA VIRUSURILOR
Ivanof A. 216

4.3. CULTIVAREA VIRUSURILOR
Sașcă C. 4.3.1. Cultivarea la animale de laborator 217. 4.3.2. Cultivarea în oul embrionat 221. 4.3.3. Cultivarea virusurilor în culturi de celule 222. 4.3.4. Consecințe ale multiplicării virale 223.

4.4. MULTIPLICAREA VIRUSURILOR
Ivanof A. 4.4.1. Generalități 225. 4.4.2. Particularități ale multiplicării virusurilor cu ADN 227. 4.4.3. Parcularități ale multiplicării virusurilor cu ARN 229.

4.5. GENETICA VIRALĂ
Sașcă C. 4.5.1. Mutațiile 232. 4.5.2. Interacțiuni genetice în infecțiile virale concomitente (reombinarea) 233. 4.5.3. Interacțiuni negenetice în infecțiile virale concomitente 234.

4.6. BACTERIOFAGUL
Sașcă C. 234

4.7. PATOGENEZA ȘI CONSECINȚA INFECȚIEI VIRALE
Ivanof A. 4.7.1. Caracteristicele infecției virale ca manifestare acută 241. 4.7.2. Infecții generalizate 242. 4.7.3. Alte consecințe ale infecției virale 244.

4.8. APĂRAREA ȘI IMUNITATEA ÎN INFECȚIILE VIRALE
Ivanof A. 4.8.1. Generalități 247. 4.8.2. Rezistența naturală 248. 4.8.3. Imunitatea 252. 4.8.4. Imunoprofilaxia infecției virale 254. 4.8.5. Chimioterapia și chimioprofilaxia în infecțiile virale 255.

4.9. FAMILIA POXVIRIDAE. VARIOLA ȘI VIRUSUL VACCINAL
Ciupe M. 257

4.10. ADENOVIRIDAE
Vancea Doina 258

4.11. HERPETOVIRIDAE
Sașcă C. 4.11.1. Herpes simplex 261. 4.11.2. Varicela — zona zoster 262. 4.11.3. Citomegalia cu incluzii 263. 4.11.4. Virusul Epstein-Barr (v. EB) și mononucleoza infecțioasă 264.

4.12. PICORNAVIRIDAE
Vancea Doina 4.12.1. Virusurile poliomielitei 266. 4.12.2. Virusurile Coxsackie și Echo 267. 4.12.3. Rhinovirusurile 268.

4.13. REOVIRIDAE
Vancea Doina 268

Scanned with OKEN Scanner

4.14. ORTHOMYXOVIRIDAE ȘI INFECȚIA GRIPALĂ
Vancea Doina 269

4.15. PARAMYXOVIRIDAE
Vancea Doina
4.15.1. Virusurile paragripale **274.** 4.15.2. Virusul urlian **275.** 4.15.3. Virusul rujeolei **275.** 4.15.4. Virusul respirator sincițial (VRS) **276.**

4.16. VIRUSUL RUBEOLEI. RUBEOLA
Ciupe M. 277

4.17. RHABDOVIRIDAE
Vancea Doina 278

4.18. ARBOVIRUSURI. ARENAVIRIDAE
Ciupe M., Sașcă C.
4.18.1. Arbovirusuri **280.** 4.18.2. Arenaviridae **282.**

4.19. HEPATITELE VIRALE
Ciupe M. Vancea Doina 283

4.20. ONCOGENEZA VIRALĂ
Ivanof A.
4.20.1. Generalități **285.** 4.20.2. Celula transformată tumoral **287.** 4.20.3. Virusuri oncogene la animale **288.** 4.20.4. Virusurile și oncogeneza umană **295.**

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ 297

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1
MICROBIOLOGIE GENERALĂ

1.1. LUMEA MICROBIANĂ

Microbiologia reunește științele biologice care au ca obiect studiul microorganismelor (*mikros* în l. greacă = mic; *bios* = viață). Această noțiune se păstrează convențional, pentru a acoperi studiul tuturor organismelor ce nu pot fi văzute, decît cu ajutorul microscoapelor. În realitate „umbrela" microbiologiei (fig. 1.1) a devenit neîncăpătoare pentru complexitatea obiectelor de studiu ce intră în structura sa. În primul rînd, dezvoltarea cunoștințelor privind lumea microorganismelor, cuprinsă în acel *Chaos infusorium* a lui L i n n é, a făcut posibil să înțelegem că varietatea, numărul imens de specii, caracteristicile diferite de cele ale plantelor și animalelor, trebuie să determine încadrarea unei părți din ele într-un regn aparte. Reluîndu-se o propunere a lui H a e c k e l (1866), la sugestia lui R. S t a n i e r (1964), s-a acceptat ca lumea microorganismelor să fie inclusă într-un al treilea regn, alături de cel vegetal și animal, regnul *Protista*. Organismele din acest regn se disting de animale și plante, printr-o organizare mai simplă, fiind organisme *unicelulare*, iar atunci cînd sînt pluricelulare, *nu formează țesuturi diferențiate*. Regnul *Protista* poate fi divizat în:

A. **Protiste superioare:** constituite din celule de tip asemănător cu cele ale organismelor animale și vegetale — celule de *tip eucariot*, și cuprind: algele, protozoarele și mucegaiurile; corespunzător se conturează discipline științifice distincte: *Algologia, Protozologia, Micologia.*

B. **Protiste inferioare:** cuprind organisme unicelulare, cu o structură anatomo-chimică mai simplă, celulă de *tip procariot*, în care sînt cuprinse algele verzi-albastre și bacteriile.

Bacteriile sînt obiectul de studiu al *Bacteriologiei.*

Clasificarea microorganismelor a întîmpinat dificultăți în decursul anilor, mai ales datorită criteriilor care au fost luate în considerare. Actualmente, pentru microorganisme, ca și pentru toate organismele vii, se folosește sistemul de clasificare al

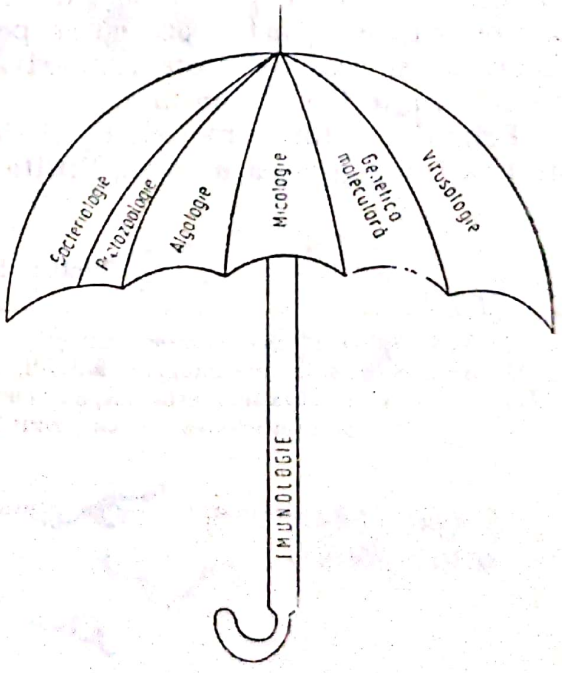


Fig. 1.1. „Umbrela" microbiologiei în care sînt incluse disciplinele constituente.

Scanned with OKEN Scanner

lui Linné. Greutățile în utilizarea acestuia derivă din insuficientele date de evoluție filogenetică, la care se adaugă imposibilitatea de definire corectă, mai ales a noțiunii de specie bacteriană. Cu toate acestea, pînă la stabilirea altor criterii, care să țină cont mai ales de caracterizarea genetică, se utilizează în continuare nomenclatura binară a lui Linné.

Pentru scopuri medicale, considerăm că este suficient să se opereze cu taxele de familie, trib, gen și specie. Așa de exemplu, *Salmonella typhi* (specie) face parte din genul *Salmonella*, tribul *Salmonelleae*, familia *Enterobacteriaceae*.

În tabelele 1.1 și 1.2, sînt prezentate clasificările Protistelor superioare și respectiv, inferioare.

Tabel 1.1.

Protiste superioare

I. Algele	1. Chlorophyta 2. Euglenophyta 3. Pyrrhophyta 4. Chrysophyta 5. Phaeophyta 6. Rhodophyta
II. Protozoarele	1. Sarcodina 2. Mastigophora 3. Sporozoa 4. Ciliata
III. Fungii	1. Zygomycotina 2. Ascomycotina 3. Basidiomycotina 4. Deuteromycotina

Pentru teoria și practica medicală bacteriile sînt importante în primul rînd, în raport cu relațiile de parazitism ale organismului uman și animal, relații în care interesează în prim plan procesele infecțioase pe care ele le pot declanșa. Procesul infecțios nu poate fi înțeles decît cunoscînd atît proprietățile de patogenitate ale bacteriilor, cît și modalitățile organismului animal de a reacționa față de agenții infecțioși. Aceasta a făcut ca în strînsă dependență cu procesul infecțios să se dezvolte cunoașterea factorilor de rezistență naturală și imunitate specifică față de infecție,conturîndu-se o nouă disciplină — **Imunologia.** În actuala dezvoltare a acestei discipline, în atenția noastră vor rămîne doar acele probleme care fac posibilă înțelegerea procesului infecțios, ca pe această bază să se poată schița metodele de diagnostic de laborator și cele de luptă împotriva factorului infecțios, cuprinse în capitolele *Infecție* și *Imunitate*.

Prin dezvoltarea metodologiei de studiu a virusurilor, a devenit posibil să înțelegem că acestea, lipsite de organizare celulară, fiind capabile

Tabel 1.2.

Protiste inferioare

I. *Cyanobacteria* (alge verzi-albastre)		
II. *Archae bacteria* (metanogeni, halofili, termoacidofili)		
III. *Bacteria* 1. Myxobacteria (nepatogene pentru om)		
2. Spirochetes — cu genurile		Treponema Borrelia Leptospira
3. Eubacteria — cu genurile		Mycobacterium Actinomyces Nocardia Streptococcus Staphylococcus Bacillus Salmonella Shigella etc.

Scanned with OKEN Scanner

să se reproducă numai prin materialul lor genetic (ereditate infecţioasă), constituie un domeniu particular al Biologiei, cu un conţinut şi metodologie proprie: *Virusologia*.

1.2. MORFOLOGIA ŞI ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A CELULEI BACTERIENE

Structura celulei bacteriene a devenit cunoscută prin utilizarea tehnicilor de microscopie optică şi electronică pe celule întregi, pe secţiuni fine sau pe fracţiuni celulare obţinute prin dezintegrare celulară. Reunirea acestor tehnici cu metodologia biochimică de caracterizare chimică şi metabolică a celulei şi a ultrastructurilor celulare, împreună cu tehnicile de genetică au dus la precizarea organizării şi a funcţiilor diferitelor structuri în viaţa celulei.

1.2.1. MORFOLOGIA BACTERIANĂ

Morfologia bacteriană studiază forma, dimensiunile şi aşezarea celulelor în urma diviziunii. Această caracterizare se face prin examinarea bacteriilor cu microscopul optic (vezi caietul de lucrări practice).

Se disting trei **forme fundamentale** (fig. 1. 2): a. *forma sferică* — coc: b. *forma cu aspect de bastonaş* — bacil; c. *forma spiralată*.

Cocii. Cocii au, în general, dimensiuni (cu mici variaţii) de un micrometru. De cele mai multe ori au aspecte deviate de la forma sferică:

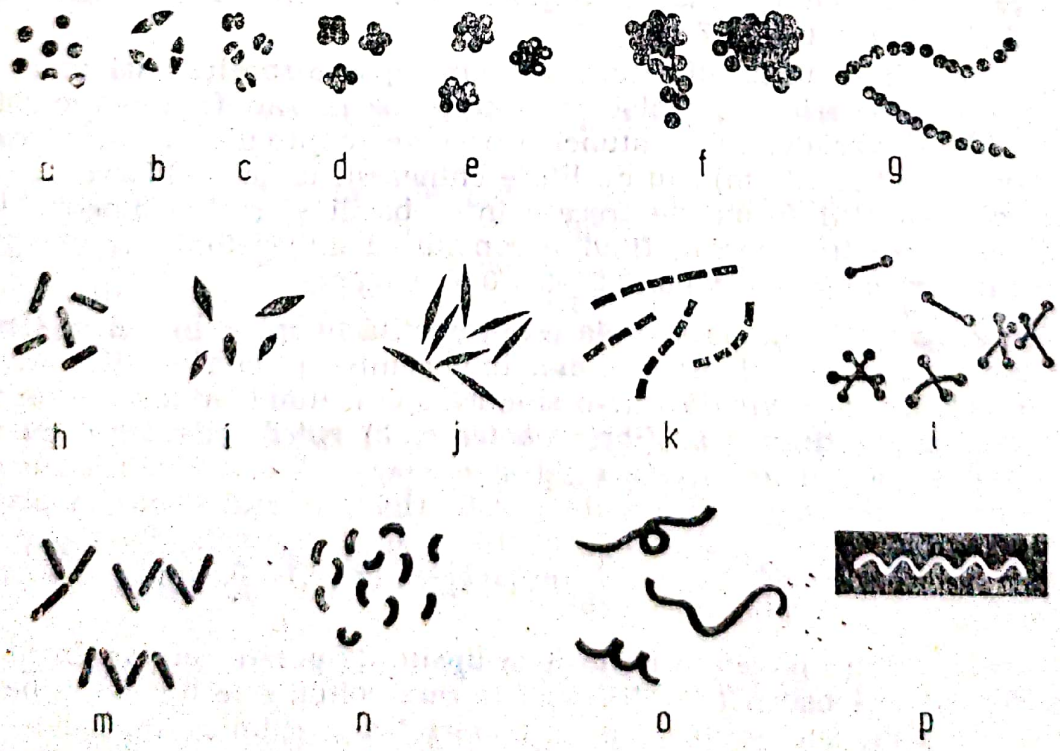


Fig. 1.2. Forma bacteriilor.

de exemplu, pneumococul este ca o sferă ușor alungită, vîrf de lance sau flacără de lumînare (fig. 1.2, b); gonococul și meningococul sînt ca o sferă turtită sub formă reniformă, cu o față concavă și cu una convexă (fig. 1.2, c).

În urma diviziunii celulare, celulele se pot separa complet una de alta, observînd în frotiu coci dispuși izolat (fig. 1.2, a); alteori celulele pot rămîne apropiate, alipite una de alta, și în frotiuri vom distinge, în funcție și de planul de diviziune, așezări caracteristice:

1. diviziunea sub formă de grămezi, ca un ciorchine de strugure, dispoziție caracteristică pentru stafilococ (*staphylos* în grecește = ciorchine de strugure) (fig. 1.2, f);

2. diviziunea în lanțuri, caracteristică pentru streptococ (*streptos* în grecește = împletit) (fig. 1.2, g);

3. în formațiuni de cîte 4 coci-tetrade, de exemplu, *Micrococcus tetragenus* (fig. 1.2, d);

4. ca aglomerări de cîte 8 coci, fiecare ocupînd colțul unui cub, luînd astfel aspect de pachet legat cu sfoară, de exemplu, *Sarcina* (fig. 1.2, e);

5. cîte doi coci, perechi de coci — diplococi ca la pneumococ și la *Neisseria* (gonococ, meningococ) (fig. 1.2, b și 1.2, c).

Bacilii. În majoritatea cazurilor au formă de cilindri, cu capetele rotunjite ca la *Escherichia coli,* sau cu capetele tăiate drept ca la *Bacillus anthracis* (fig. 1.2, h și k). Alteori, bacilii iau forme modificate: astfel, bacilul difteric, datorită corpusculilor metacromatici Babeș-Ernst, poate să ia formă de halteră sau de pișcot (fig. 1.2, l), iar bacilul tetanic, datorită sporului, are aspect de băț de toboșar sau ac de gămălie; alteori, celula bacteriană se înfățișează sub aspect de fus *(Fusobacterium fusiformae)* (fig. 1.2, j).

Dimensiunea bacililor se exprimă în două diametre: diametru longitudinal și diametru transversal. Din acest punct de vedere putem să distingem bacili cu dimensiuni mijlocii de 2—4 μm/0,2—0,5 μm; bacili mari, de 7—11 μm/0,8—1,3 μm.

Și la bacili în urma diviziunii celulare apar dispoziții mai mult sau mai puțin caracteristice: diplobacili, streptobacili sau formînd unghiuri cu deschideri variate, luînd atunci aspect de majuscule: Y, Z, W ca la b. tuberculos (fig. 1.2, m) sau de litere chinezești ca la b. difteric.

Cocobacilii sînt forme de trecere între bacili și coci, diametrul longitudinal și cel transversal, fiind apropiate ca dimensiune, de exemplu, *Brucella, Bordetella, Yersinia* (0,2—0,3/0,5—0,8 μm).

Forma spiralată, în care celula este învîrtită în spire. În cadrul formei spiralate distingem trei aspecte mai importante: 1. vibrion (fig. 1.2, n), la care celula este învîrtită într-o singură spiră, luînd înfățișarea de virgulă, așa cum întîlnim la *Vibrio cholerae;* 2) *spirili adevărați,* cu mai multe spire, dar cu un perete rigid și din această cauză celula nu este flexibilă; 3. *spirochete,* lipsite de perete rigid, flexibile, cu citoplasma neseptată *(Treponema pallidum)* (fig. 1.2, o și p). Spirochetele sînt celule subțiri și lungi, avînd diametrul transversal de 0,1—0,3μm și diametrul longitudinal de 5—12 μm.

Forme întîlnite la celule bacteriene lipsite de perete celular. În lumea bacteriilor există bacterii *(Mollicutes)* la care celula este lipsită de perete celular. În plus, sub acțiunea unor factori fizici, chimici (mai ales chimioterapice) și biologici, la majoritatea speciilor bacteriene este posibil,

Scanned with OKEN Scanner

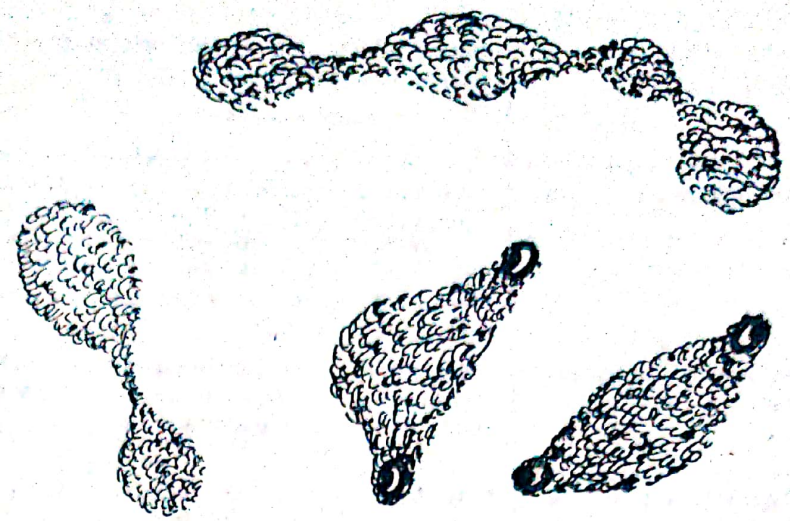


Fig. 1.3. Forme celulare la Mycoplasma.

în condiții naturale sau de laborator, să apară variante la care celula este lipsită de perete celular, acestora dîndu-li-se numele de *forme L.*

Deosebirea esențială între Mycoplasme și formele L constă în faptul că în timp ce formele L, după încetarea acțiunii factorului inductor, se reîntorc la forma bacteriană tipică din care au provenit (deci, cu perete celular), Mycoplasmele se mențin în permanență în forma descrisă. Între celula acestor bacterii și celelalte celule procariote, nu există deosebiri esențiale, cu excepția lipsei peretelui celular, nefiind prezent un ciclu particular de multiplicare. Au dimensiuni între 0,33 și 1 μm și se multiplică tot prin fisiune binară. Ca morfologie se întîlnesc cîteva forme caracteristice speciilor de Mycoplasme (fig. 1.3): celule cocoidale; celule cocoidale cu aspect de diplococi, frecvent legate prin tuburi membranoase sau chiar dispuse în lanțuri; celule filamentoase, cu structuri terminale în formă de veziculă; celule în formă de pară, cu structuri terminale în formă de măciucă.

1.2.2. CELULA BACTERIANĂ, CELULĂ DE TIP PROCARIOT

Bacteriile ca Protiste inferioare reprezintă organisme unicelulare cu o celulă cu structură particulară, primitivă — celula de tip procariot (ceea ce face ca bacteriile să fie încadrate în procariote). Caracteristicile acestui tip de celulă prin care se diferențiază de celula de tip eucariot, întîlnită la toate celelalte organisme vii, sînt prezentate în tabelul 1.3.

1.2.3. ORGANIZAREA ULTRASTRUCTURALĂ A CELULEI BACTERIENE

Planul general de organizare a celulei bacteriene. Celula procariotă este constituită așa cum se vede în figurile 1.4 și 1.5 din două categorii de structuri subcelulare:

— *obligatorii:* nucleoid, citoplasmă, membrană citoplasmatică și perete celular.

— *facultative:* capsulă, cili, pili și endospori.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.3.

Caracteristicile celulei eucariote și procariote

	Celula eucariotă	Celula procariotă
Organizarea nucleului	Formațiune morfologică, cu membrană proprie și nucleu cu nucleol; sînt prezenți cromozomii (nucleoproteine). În timpul diviziunii se formează aparatul mitotic.	Are un nucleoid sau echivalent nuclear constituit dintr-o singură moleculă inelară de ADN. Nu are aparat mitotic. Nu are cromozomi propriu-ziși.
Organizarea citoplasmei	Citoplasmă compartimentată de organite celulare: mitocondrii, reticul endoplasmatic, aparat Golgi.	Citoplasmă necompartimentată. Lipsesc organitele celulare.
Organizarea peretelui celular	Este lipsită de perete celular sau la cele care îl posedă (levuri, plante), are o structură distinctă.	Are perete celular cu structură caracteristică: peptidoglicanul, în compoziția căruia intră acidul N-acetil muramic.
Organizarea ribozomilor	80 S (unități de 60 S și 40 S).	70 S (unități de 50 S și 30 S).
Diviziunea celulară	Prin mitoză și pe cale sexuată cu formarea zigotului prin meioză.	Prin sciziparitate. Formarea zigotului (merozigot) la bacterii este o formă rară de recombinare genetică.

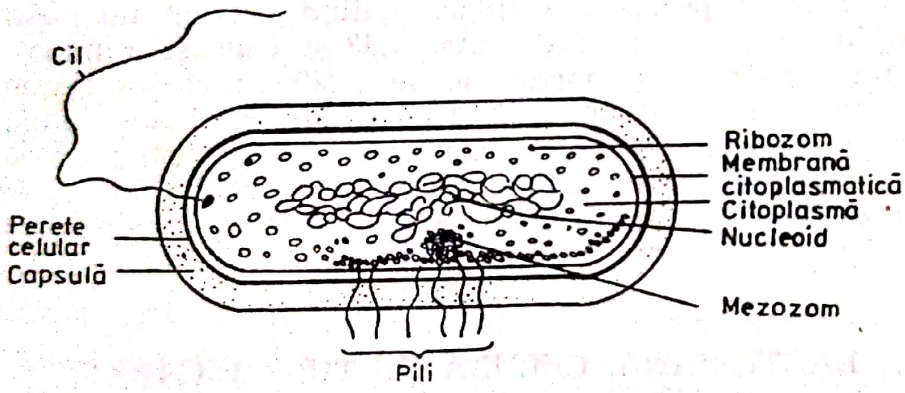


Fig. 1.4. **Planul de organizare al celulei bacteriene.**

Fig. 1.5. **Microelectronografia unei secțiuni dintr-o celulă bacteriană în curs de diviziune.**

Scanned with OKEN Scanner

La o specie bacteriană la care caracteristic sînt prezente una sau mai multe din formaţiunile facultative, se pot obţine variante (mutante) la care acestea lipsesc, fără să fie influenţată multiplicarea lor; de aceea sînt numite facultative.

A. *Nucleoidul* sau *echivalentul nuclear* este deţinătorul informaţiei genetice a celulei, răspunzător de ereditate cromozomială. El poate fi evidenţiat cu dificultate în celulă datorită bazofiliei puternice a citoplasmei, fiind nevoie de tehnici speciale. Pe baza datelor de microscopie electronică, a marcării radioactive şi a izolării lui din celulă prin extracţie chimică s-a stabilit că nucleoidul este constituit dintr-o moleculă circulară de ADN cu greutate moleculară de $2{,}8 \times 10^9$ daltoni. Atunci cînd molecula este desfăşurată are o lungime de 1000 μm, ceea ce arată că în celulă ea se găseşte înfăşurată într-o formă superelicoidală, ceea ce în secţiunile transversale, îi conferă aspectul fibrilar. Nucleoidul este legat de membrana citoplasmatică printr-un mezozom. În afară de nucleoid, în celula bacteriană pot exista molecule de ADN circular, de greutate moleculară mai mică. Ele sînt formaţiuni genetice numite *plasmide,* responsabile de ereditatea extracromozomială.

B. *Citoplasma,* puternic bazofilă, are în microelectronofotografii aspect fin şi omogen granular, datorat numărului mare de ribozomi (20 000—40 000), care reprezintă sediul sintezei proteice. Cantitatea mare de ARN (ARNr, ARNm, ARNt), care reprezintă în celulele active metabolic pînă la 25% din greutatea uscată, conferă citoplasmei proprietatea de bazofilie. Sînt absente organitele celulare, astfel că ea este necompartimentată. În citoplasmă se evidenţiază *mezozomii,* care reprezintă invaginaţii ale membranei. Se pot găsi de asemenea *incluzii,* care reprezintă material nutritiv de rezervă (tabel 1.4) şi *vacuole* (lichide şi gazoase). Există în sfîrşit 3 000—6 000 tipuri diferite de molecule, de la apă pînă la acizi nucleici.

Tabel 1.4.

Compoziţia şi tipurile de incluzii la bacterii

Tipul de incluzie	Compoziţie chimică	Specii bacteriene
Corpusculii Babeş-Ernst	Volutină, polimer de metafosfat	Corynebacterium dyphteriae
Incluzii de glicogen	Polimer de glucoză	Enterobacterii
Substanţa granuloasă	Asemănătoare cu amidonul	Clostridium
Incluzii lipidice	Poli-beta-hidroxibutirat	Multe specii

C. *Membrana citoplasmatică* (M. C.) reprezintă o formaţiune greu de evidenţiat în celula normală, datorită presiunii osmotice endocelulare ridicate, fiind ataşată strîns de peretele celular. Pentru a observa membrana citoplasmatică se recurge la mai multe procedee tehnice. La celulele suspendate în soluţii hipertonice, prin pierderea de apă, citoplasma se retractă, iar membrana citoplasmatică se îndepărtează de perete (plasmoliză). La multe specii de bacterii grampozitive peretele celular poate fi îndepărtat sub acţiunea lizozimului, rezultînd o formaţiune celulară lipsită de perete, numită *protoplast.* La bacteriile gramnegative peretele

Scanned with OKEN Scanner

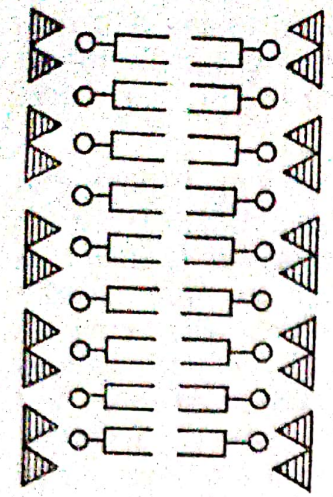


Fig. 1.6. Modelul structurii membranei citoplasmatice al lui Danielli și Davson.

se îndepărtează foarte greu, adăugîndu-se la acțiunea lizozimului și efectul EDTA (etilen-diamino-tetraacetic acid). Chiar în aceste condiții mai rămîn resturi din peretele celular, ceea ce a făcut ca acestor celule să li se dea numele de *sferoplaști*. Protoplaștii și sferoplaștii în medii hipotone se lizează, eliberîndu-se în mediu materialul conținut în membrana citoplasmatică. În medii hipertone ei iau forme sferice, indiferent de forma bacteriei din care au provenit. Membranele citoplasmatice rezultate din liza proto- și sferoplaștilor pot fi purificate prin centrifugări fracționate și analizate din punct de vedere structural, al compoziției chimice și al activității biochimice.

Membrana citoplasmatică bacteriană are structură asemănătoare cu membranele altor celule. Pornind de la modelul Danielli-Davson (fig. 1.6) s-a ajuns la modelul în care membrana este reprezentată ca un mozaic, în fluidul lipidic găsindu-se insule funcționale de proteine, în mobilitate permanentă (fig. 1.7). Ea are următoarele funcții:

1. Funcționează ca barieră osmotică și membrană selectivă, conferită de sistemele de transport, realizînd o concentrație endocelulară contragradient a substanțelor nutritive din mediu de pînă la 1 000 de ori.

2. Este sediul proceselor bioenergetice, în ea fiind structurat lanțul respirator și găsindu-se multe din enzimele ciclului acizilor tricarboxilici. Ea preia astfel rolul mitocondriilor din celula eucariotă.

3. Participă împreună cu mezozomii în replicarea ADN-ului în diviziunea celulară (formarea septului care separă cele două celule fiice) și în formarea sporului.

4. Intervine în sinteza peretelui celular, mai ales în transportul precursorilor din care acesta este constituit.

5. Reprezintă structura țintă asupra căreia acționează nociv substanțe chimice, dezinfectante (detergenți) și unele antibiotice.

D. *Peretele celular* (P. C.) reprezintă o formațiune rigidă care asigură menținerea formei celulei bacteriene în condițiile existenței unor diferențe

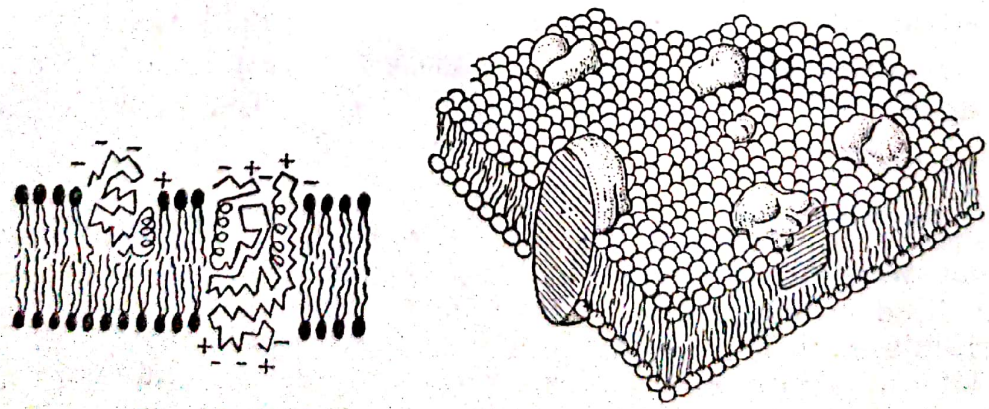


Fig. 1.7. **Modelul structurii membranei citoplasmatice.**
În stratul bimolecular de fosfolipide sînt înglobate moleculele de proteină, cu regiunile hidrofobe proeminînd pe suprafața internă sau externă; unele pe ambele fețe (după Singer și Nicolson).

Scanned with OKEN Scanner

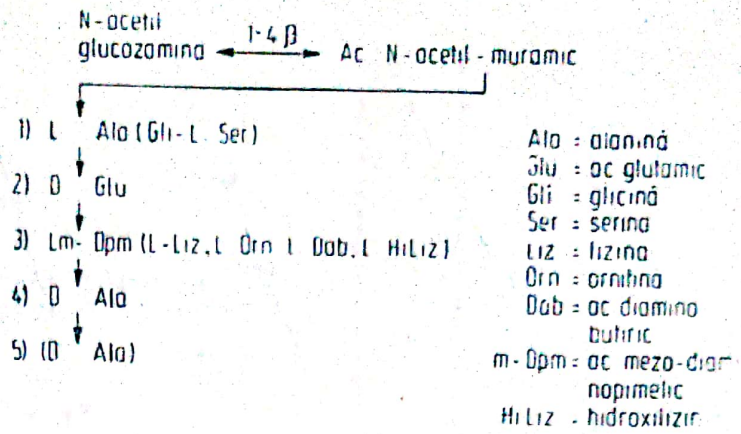


Fig. 1.8. Structura unității care se repetă în peptidoglican.

mari de presiune între interiorul celulei și mediul extern, de 5—20 atm, mai mare la gram+, decît la gram—. De aceea și peretele celor două categorii au grosime și structură diferite.

Trecînd peste aceste variații există întotdeauna în P. C. un compus chimic, responsabil de conferirea rigidității denumit peptidoglican (mai puțin uzitat, mureină). Peptidoglicanul este, așa cum arată și numele, constituit dintr-o componentă glican și una peptidică.

Glicanul este de o uniformitate remarcabilă, fiind constituit din alternarea moleculelor de N-acetil-glucozamină cu cele de acid N-acetil-muramic (acesta prezent exclusiv la procariote), legate 1-4-β-glicozidic (fig. 1.8.).

Subunitatea peptidică este constituită din 5 resturi de aminoacizi, cu alternarea formei L cu forma D: L-alanina legată de acidul N-acetil-muramic, urmînd apoi acidul D-glutamic, un diaminoacid, și două resturi de D-alanină. Dizaharidul (N-acetil-glucozamină și acidul N-acetil-muramic) împreună cu peptidul formează *unitatea care se repetă* în molecula de peptidoglican pentru a rezulta catenele lineare (fig. 1.9). În structura peptidului se găsesc variații care interesează, mai ales, poziția 3 de la bacteriile grampozitive, la care diaminoacidul poate fi reprezentat de lizină, hidroxilizină, ornitină, acid diaminobutiric etc. La bacteriile gramnegative se găsește în poziția 3 acidul L-mezo-diaminopimelic (întîlnit numai la celulele procariote).

Pentru a se forma molecula gigant de peptidoglican, care învelește ca un sac celula procariotă, între catenele lineare apar legături interpeptidice. Legătura interpeptidică se face între diaminoacidul din poziția 3 de pe o catenă și D-alanina din poziția 4 dintr-o unitate repetativă dintr-o altă catenă, printr-o reacție catalizată de o transpeptidază, cu eliminarea restului de D-alanină din poziția 5. Există diferențe în modalitatea de legare interpeptidică, la bacteriile grampozitive existînd și pentru aceasta o variabilitate mai mare. Pentru exemplificare, la *Staphylococcus aureus* legătura interpeptidică are loc între gruparea ε—NH_2 a lizinei și carboxilul D-alaninei, printr-o punte peptidică formată din 5 resturi de glicină (pentapeptid) așa cum se vede în figura 1.9. La *Escherichia coli*, și în general la toate bacteriile gramnegative, legătura interpeptidică se realizează direct între acidul mezodiamino-pimelic dintr-o unitate și D-alanina dintr-o unitate de pe altă catenă (v. fig. 1.9).

Prin legăturile 1-4-β-glicozidice din glican, legăturile peptidice dintre acidul N-acetil-muramic și L-alanina din peptid și legăturile interpeptidice din unități ce se repetă din catene alăturate, se ajunge la structura

Scanned with OKEN Scanner

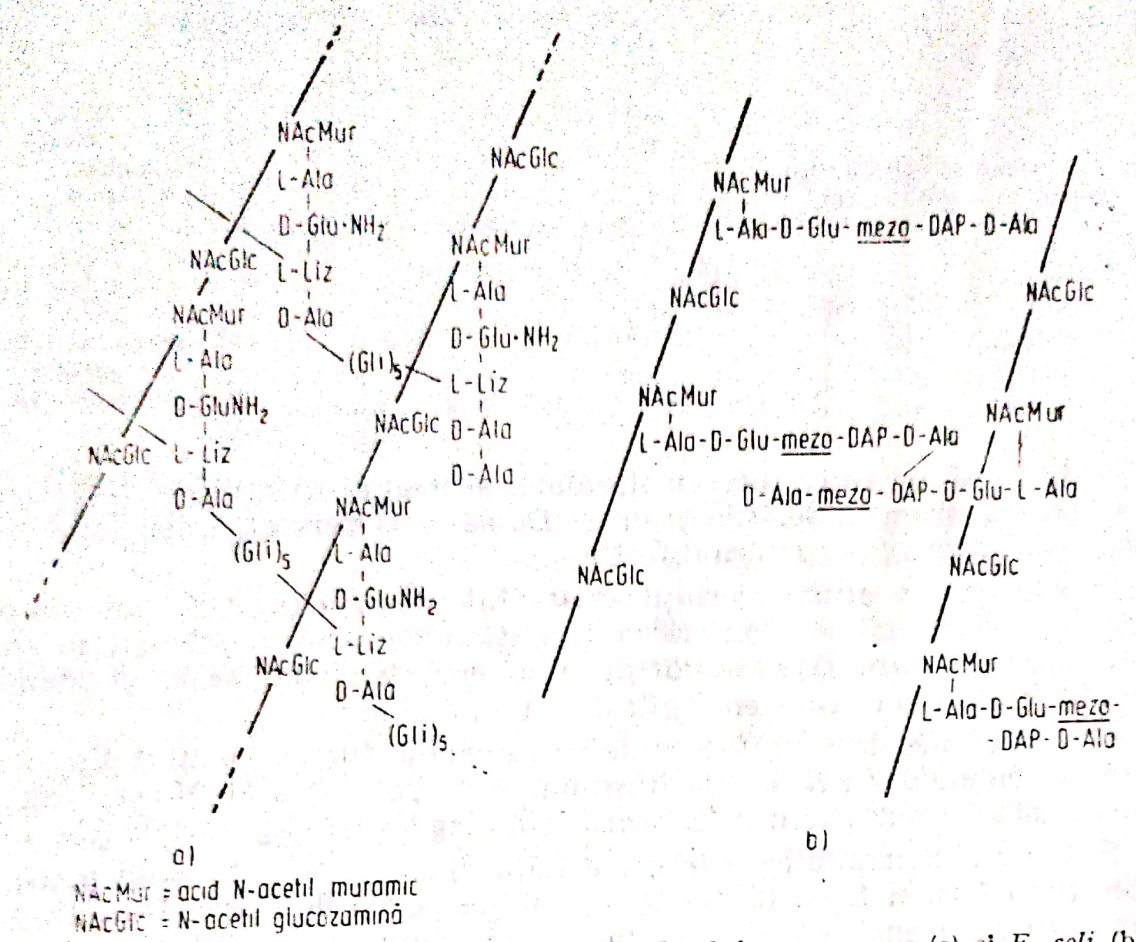


Fig. 1.9. **Peptidoglicanul din peretele celular de la** *Staphylococus aureus* (a) **şi** *E. coli* (b).

bi- sau tridimensională, care constituie stratul rigid, ce învelește ca într-un sac celula bacteriană.

— *P. C. al bacteriilor grampozitive,* deşi mai gros, este ultrastructurat relativ simplu, într-un strat uniform, constituit chimic din mai multe lanțuri suprapuse de peptidogligan (10—50% din greutatea uscată a peretelui), apoi polizaharide şi acizi teichoici (40—60% din greutatea uscată), legați covalent de acidul N-acetil-muramic.

Acizii teichoici (*teichos* în greacă = perete) sînt polimeri de ribitol-fosfat sau, mai rar glicerolfosfat, uniți prin legături fosfodiesterice. De aceste unități care se repetă în acizii teichoici, se leagă monozaharide, aminozaharuri şi resturi de D-alanină. Pe această bază se poate spune că polizaharidele bacteriilor grampozitive rezultă din legarea acestor molecule la lanțurile de ac. teichoici. La unele bacterii se găsesc acizii teichuronici, constituiți din monozaharide şi acid uronic polimerizate prin legături glicozidice. Acizii teichoici reprezintă principalele antigene de suprafață ale bacteriilor ce-i conțin. S-au evidențiat de asemenea aşa numiții ac. lipoteichoici, care se leagă de membrana citoplasmatică şi a căror moleculă polimerizată străbate toată grosimea peretelui celular (fig. 1.10).

— *P. C. al bacteriilor gramnegative* este mai subțire dar cu o structură mai complexă. Din punct de vedere al constituției chimice peretele gramnegativelor se caracterizează printr-o proporție redusă de mureină, mai puțin de 5—10% din greutatea uscată, fiind bogate în proteine şi lipide şi mai sărace în polizaharide decît bacteriile grampozitive.

Scanned with OKEN Scanner

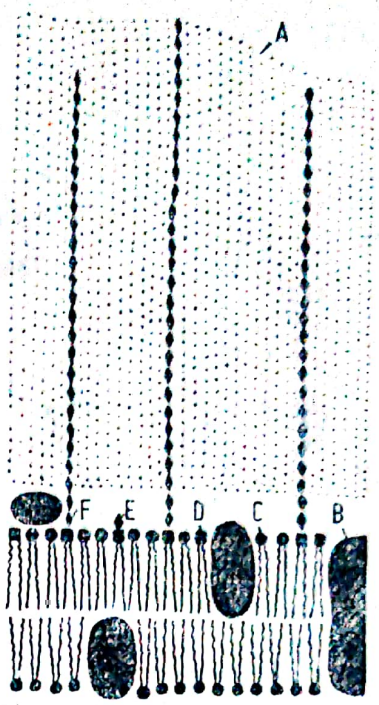


Fig. 1.10. Acizii lipoteichoici, extinzîndu-se de la membrana citoplasmatică în toată grosimea peretelui celular.

Acizi lipoteichoici se leagă covalent de acidul N-acetilmuramic:

A — perete celular; *B* — proteină; *C* — fosfolipid; *D* — glicolipid; *E* — fosfatidilglicolipid; *F* — acid lipoteichoic.

Aşa cum se vede din figurile 1.11 şi 1.12, peretele celular este multistratificat:

a. *peptidoglicanul,* format din 1—2 straturi moleculare;

b. *moleculele de lipoproteine,* care prin componenta lor proteică se leagă de un rest de acid L-diaminopimelic din peptidoglican şi, prin cea lipidică, pătrunde în membrana externă, servind ca elemente de susţinere a acesteia din urmă;

c. *membrana externă* (M. E), reprezentînd ca şi M. C. un mozaic fluid constituit din fosfolipide şi proteine. Între ultimele 3—4 tipuri de molecule reprezintă 70% din totalul proteinelor M. E., fiind de aceea numite *proteine majore.* Două din acestea străbat toată grosimea M.E., se organizează în triplete, asociate cu 3 molecule de lipoproteine, formînd canale (pori de difuziune), care permit trecerea substanţelor hidrofile cu moleculă mică. *Proteinele minore* (cantitativ) formează un set de 12 tipuri moleculare, care au funcţii diferite: transportul specific pentru molecule mici (complexe de Fe^3, maltoză, nucleotide, vitamina B_{12}); receptori pen-

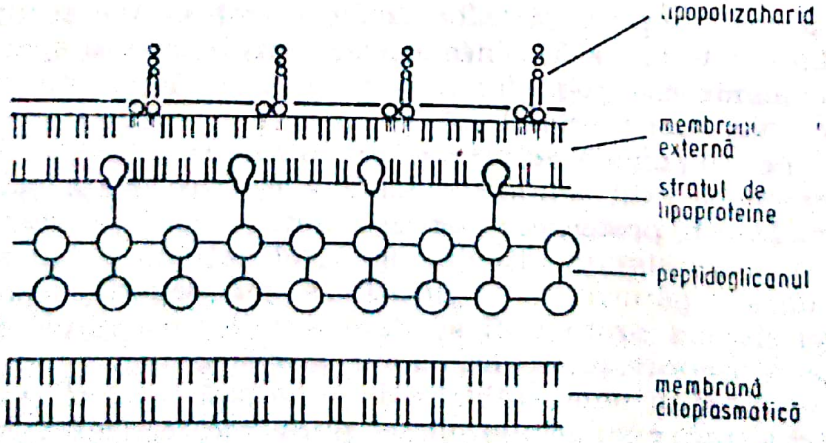


Fig. 1.11. Schema peretelui celular la bacteriile gramnegative.

Scanned with OKEN Scanner

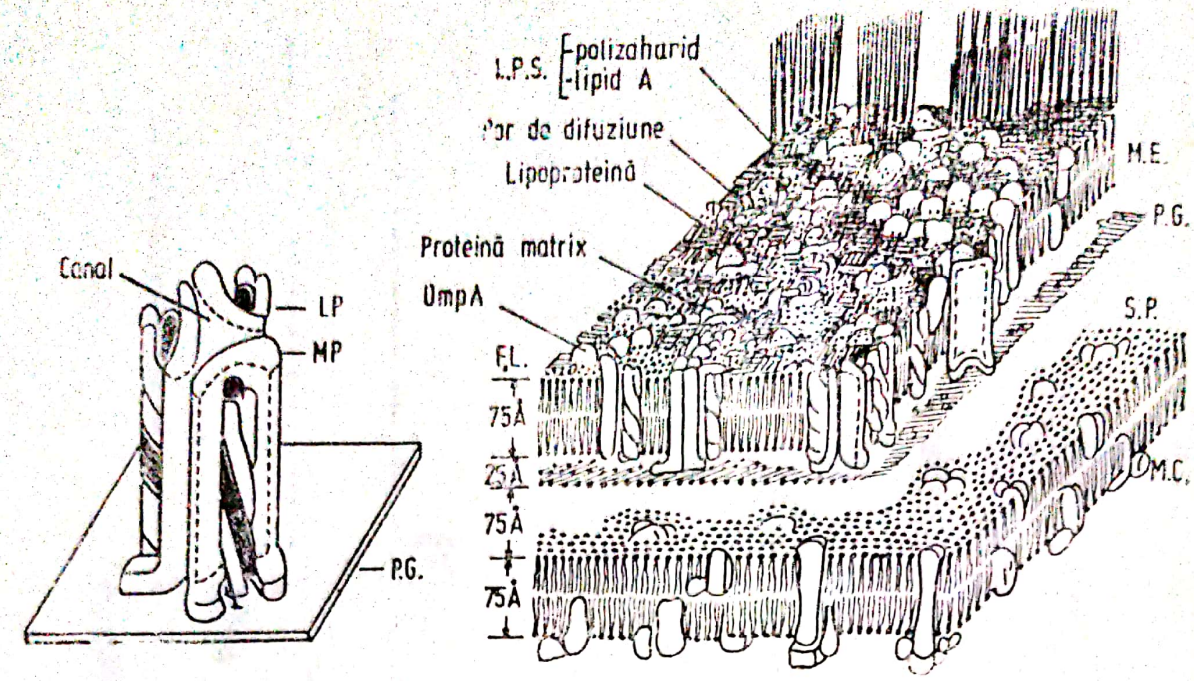


Fig. 1.12. **Membrana externă din peretele bacteriilor gramnegative.**

A — Modelul dispoziției proteinei matrix (MP) și a lipoproteinelor (LP), pentru a forma un canal de difuziune pentru trecerea moleculelor hidrofile mici. Unele molecule de lipoproteină se atașază de peptidoglican. B. *Modelul suprafeței celulare la E. coli*:

F L — fosfolipid; M.E. — membrană externă; M.C. — membrană citoplasmatică; S.P. — spațiu periplasmic; P.G. — peptidoglican; OmpA — denumirea unei proteine majore; L.P.S. — lipopolizaharid (după Di Rienzo și al.).

tru pili sexuali, colicine, bacteriofagi; implicate în replicarea ADN-ului și diviziunea celulară;

d. *lipopolizaharidul.* Suprafețe relativ întinse ale lanțului exterior de fosfolipide ale M.E. sînt înlocuite cu molecule de lipopolizaharid, constituenți esențiali ai antigenului O sau endotoxinei. Componenta lipidică (lipidul A) intră în structura M.E., iar polizaharidele se dispun ca proeminențe pe suprafața P.C. (fig. 1.12);

e. între peptidoglican și M.E. se formează o zonă numită spațiu periplasmic, în care se concentrează enzime hidrolazice.

Funcțiile P.C. sînt multiple:

1. Asigură menținerea formei celulei.

2. Constituie o barieră, sită moleculară, permițînd trecerea spre M.C. a substanțelor de o anumită greutate moleculară, controlînd difuziunea ionilor, în același timp avînd la bacteriile gramnegative și intervenții de transport. La aceste bacterii, concentrarea hidrolazelor în spațiu periplasmic face economicoasă degradarea în această poziție a substanțelor nutritive în compuși transportabili de M.C.

3. Intervine, cu funcția de *primer,* în sinteza proprie.

4. De asemenea prin acțiunea unor enzime care degradează P.C., glicozidaze, amidaze și proteaze, se produc goluri în P.C., reprezentînd zone de creștere în care sînt incluși precursorii diferitelor componente structurale. Asupra legăturii 1—4 glicozidice din peptidoglican acționează lizozimul, producînd protoplaști și sferoplaști. El constituie ținta de acțiune a unor antibiotice și în prim plan a β-lactaminelor.

5. P.C. este sediul unor antigene de suprafață celulară, foarte importante în inducerea răspunsului imun și în caracterizarea antigenică a bacteriilor (antigenul O, carbohidratul C etc.).

Scanned with OKEN Scanner

E. *Capsula* propriu-zisă este constituită dintr-un strat amorf, situat la suprafaţa peretelui celular, evidenţiabil cu microscopul optic (fig. 1.13). La bacteriile patogene poate exista şi un strat mucos subţire, detectabil numai prin microscopia electronică. Bacteriile cu capsulă mai importante, ca şi compoziţia ei chimică, sînt prezentate în tabelul 1.5.

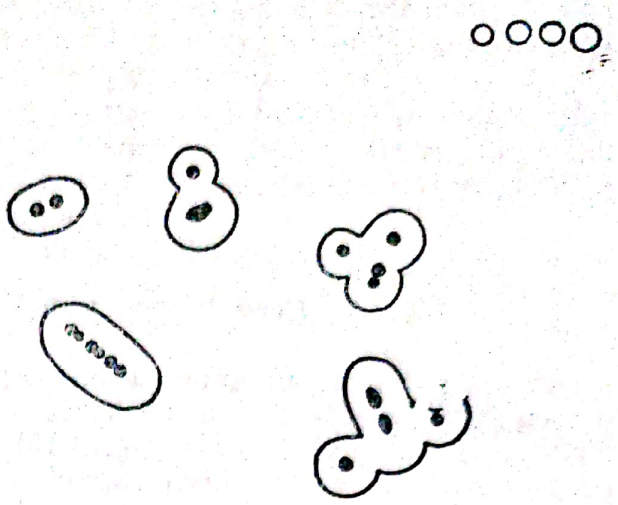


Fig. 1.13. **Bacterii cu capsulă.**

Capsula conferă, prin împiedicarea fagocitozei, proprietăţi de patogenitate, pierderea capsulei (variaţiunea S—R), fiind însoţită şi de pierderea capacităţii de a produce infecţie (de exemplu, la pneumococ). Ea are importanţă practică în identificarea bacteriană, şi în caracterizarea antigenică a bacteriilor. Astfel, polizaharizii din capsula pneumococului conturează peste 80 de tipuri antigenice.

Tabel 1.5.

Natura chimică a capsulei bacteriene

Specia bacteriană	Natura chimică	Subunităţi chimice
Streptococcus pneumoniae tipul VI antigenic	Polizaharidică	Monozaharide: galactoză, glucoză, ramnoză
Klebsiella pneumoniae	Polizaharidică	Monozaharide
Streptococcus pyogenes	Acid hialuronic	N-acetilglucozamină, acid glucuronic
Leuconostoc mesenteroides	Dextran	Glucoză
Bacillus anthracis	Polipeptidică	Acid-D-glutamic

Glicocalixul: în condiţiile naturale de existenţă a bacteriilor, la unele specii, celulele sînt acoperite cu o masă de fibre polizaharidice întretăiate (ca de exemplu, dextran sau levan), care reprezintă factori de adeziune. *Streptococcus mutans* de exemplu, îşi datoreşte aderarea de suprafaţa dentară glicocalixului. Glicocalixul este sintetizat de enzime extracelulare, legate însă de celulă.

F. *Cilii* sînt formaţiuni filamentoase, flexibile, subţiri (10—30 nm ∅) şi lungi (5—25 μm), care conferă celulei proprietatea de mobilitate; ei sînt deci organe de locomoţie.

După prezenţa, numărul şi aşezarea cililor pe celulă, bacteriile sînt caracterizate ca *atriche, monotriche, amfitriche, lofotriche* şi *peritriche* (fig. 1.14).

Chimic ei sînt constituiţi din subunităţi identice proteice, numite flagelină. Agregarea prin autoasamblare a subunităţilor formează un ci-

Scanned with OKEN Scanner

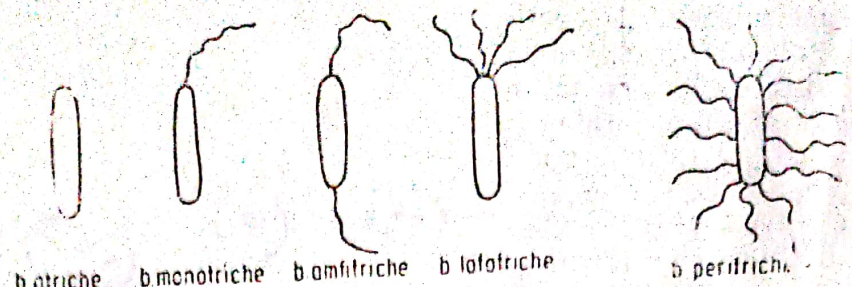


Fig. 1.14. Tipuri de celule bacteriene în raport de dispoziția cililor.

lindru gol: filamentul axial. Microscopia electronică a arătat că cilul are o structură complexă: *corpul bazal,* format din două perechi de discuri, *cîrligul* și *filamentul ciliar* (fig. 1.15). Modalitatea atașării de membrană asigură energia și mișcarea rapidă de rotire a filamentului ciliar, conferind mobilitatea. Cele două discuri fixează cilul de celulă.

Cilii conferă *mobilitatea* bateriilor și aceasta constituie o proprietate de identificare a acestora. Totodată sînt răspunzători de fenomenul de *chemiotaxie:* mobilitatea direcționată spre o substanță nutritivă determinată de existența în membrană a unor receptori specifici, care uneori participă și în transportul substanței respective. Fiind proteine, imunologic reprezintă antigene specifice: antigene ciliare sau antigene H.

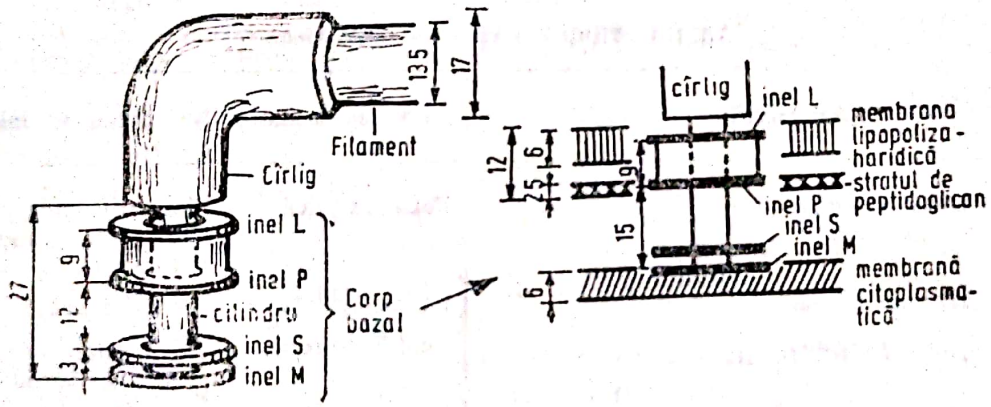


Fig. 1.15. Modelul cilului de *E. coli* după datele de microscopie electronică.

Aparatul locomotor la spirochete este situat în celulă, între peptidoglican și membrana externă a P.C. cu o organizare particulară așa cum se vede în figura 1.16.

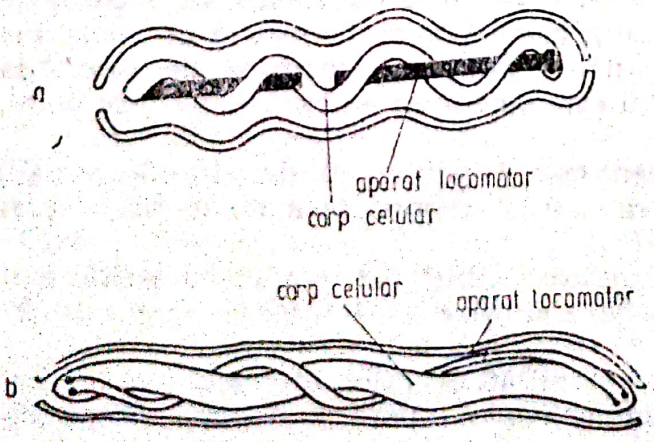


Fig. 1.16. Aparatul locomotor la: *a — Leptospira* **și** *b — Treponema pallidum.*

G. *Fimbriile* sau *pilii* sînt formaţiuni filamentoase rigide, neflexibile. Nu sînt organe locomotorii, fiind prezenţi atît la bacterii mobile cît şi imobile. Se cunosc două tipuri principale (fig. 1.4.):

a. Pilii comuni, în număr mare, peste 100 pe o celulă bacteriană, sînt scurţi, 0,5—2 μm şi cu un diametru de 70 nm, constituiţi dintr-o proteină căreia prin analogie cu cea de la cili i s-a dat denumirea de pileină. Pilii reprezintă antigene specifice — antigene piliare.

Prezenţa lor pe celulă poate fi corelată cu capacitatea de a adera de suprafeţe netede, ceea ce conferă proprietatea hemaglutinantă a suspensiilor de celule bacteriene care posedă fimbrii şi proprietatea de adeziune de suprafaţa mucoaselor, avînd rol de factori de patogenitate.

b. Pilii sexuali: la tulpinile masculine de *E. coli* s-au evidenţiat 1—4 pili, cu o lungime de pînă la 20 μm, cu un diametru de 8,5 nm terminaţi printr-o umflătură, ca un buton. Ei au determinism plasmidic şi rol important în conjugarea bacteriană.

I. *Sporii* sînt formaţiuni care se dezvoltă în interiorul celulei bacteriene (endospori), cu proprietăţi distincte de aceasta, într-un anumit stadiu de dezvoltare al culturii bacteriene, în relaţie cu reducerea din mediu a unor metaboliţi, printr-un control genetic bine definit. La bacterii, sporii nu constituie o formă de înmulţire; ultrastructura şi constituţia chimică le determină însă o mare rezistenţă la agenţi fizici şi chimici, ceea ce face să fie consideraţi forme de rezistenţă.

În bacteriologia medicală două genuri sporulate prezintă interes: genul *Bacillus*, cu reprezentantul patogen *Bacillus anthracis* şi bacteriile sporulate anaerobe din genul *Clostridium*.

Prin tehnici speciale de studiu, s-a observat că sporii pot avea formă sferică sau ovalară, cu localizare variată în celula bacteriană — centrală, subterminală sau terminală. Dacă sporul are diametrul mai mic decît diametrul transversal al celulei, forma acesteia rămîne nemodificată *(Bacillus)* (fig. 1.17, a). La *Clostridium* sporul depăşeşte diametrul celulei, duce la deformarea acesteia şi, în raport cu aşezarea în celulă se întîlnesc cîteva aspecte morfologice caracteristice (fig. 1.17 b, c, d).

Ultrastructura sporului (fig. 1.18) a putut fi cunoscută prin microscopia electronică şi schiţat se poate prezenta astfel: în centrul sporului există *protoplastul,* învelit de *peretele sporal,* din care se va forma în germinare peretele celulei vegetative. Se găsesc apoi mai multe straturi: *cortexul,* constituit ca şi peretele din peptidoglican, *membrana externă sporală* şi *învelişurile sporale,* ce apar ca structuri multistratificate, variind în complexitate de la o specie la alta. Învelişurile sporale sînt constituite predominant din proteine caracterizate printr-un conţinut bogat în cisteină-cistină.

Din punct de vedere chimic sporul se caracterizează prin mari concentraţii de dipicolinat de Ca (5—15% din greutatea uscată), prezent în lumea vie numai la spor. Împreună cu conţinutul foarte redus în apă şi

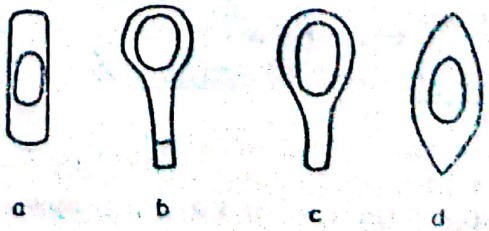


Fig. 1.17. Celule bacteriene cu spori:
a — Bacillus anthracis; b — Clostridium tetani (formă de băţ de toboşar); *c — Cl. botulinum* (formă de rachetă); *d — Cl. sporogenes* (formă de suveică sau bărcuţă).

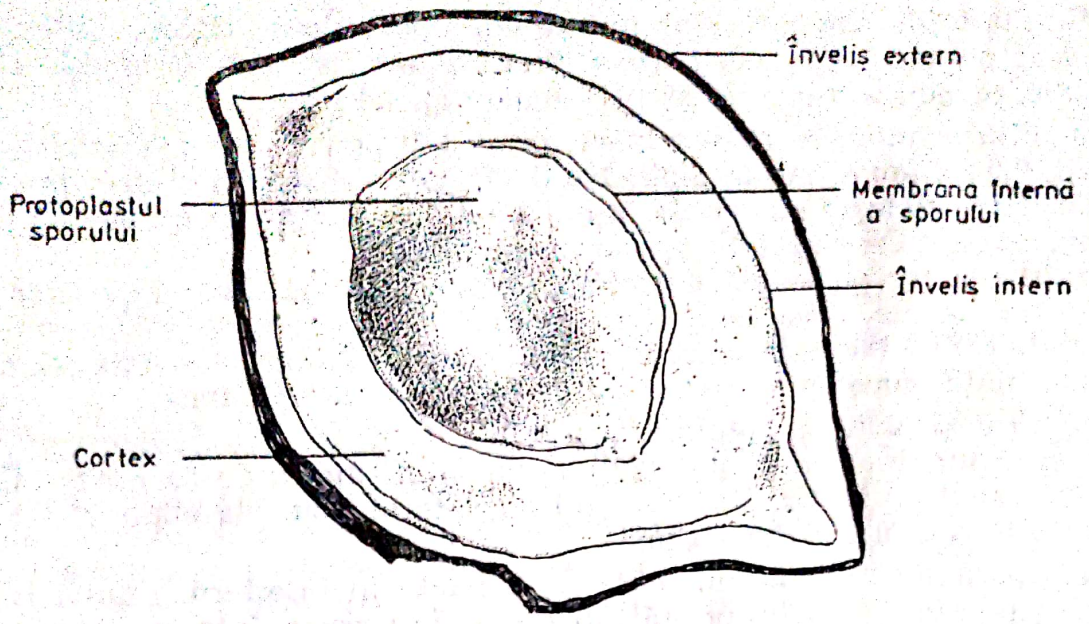


Fig. 1.18. **Ultrastructura sporului.**

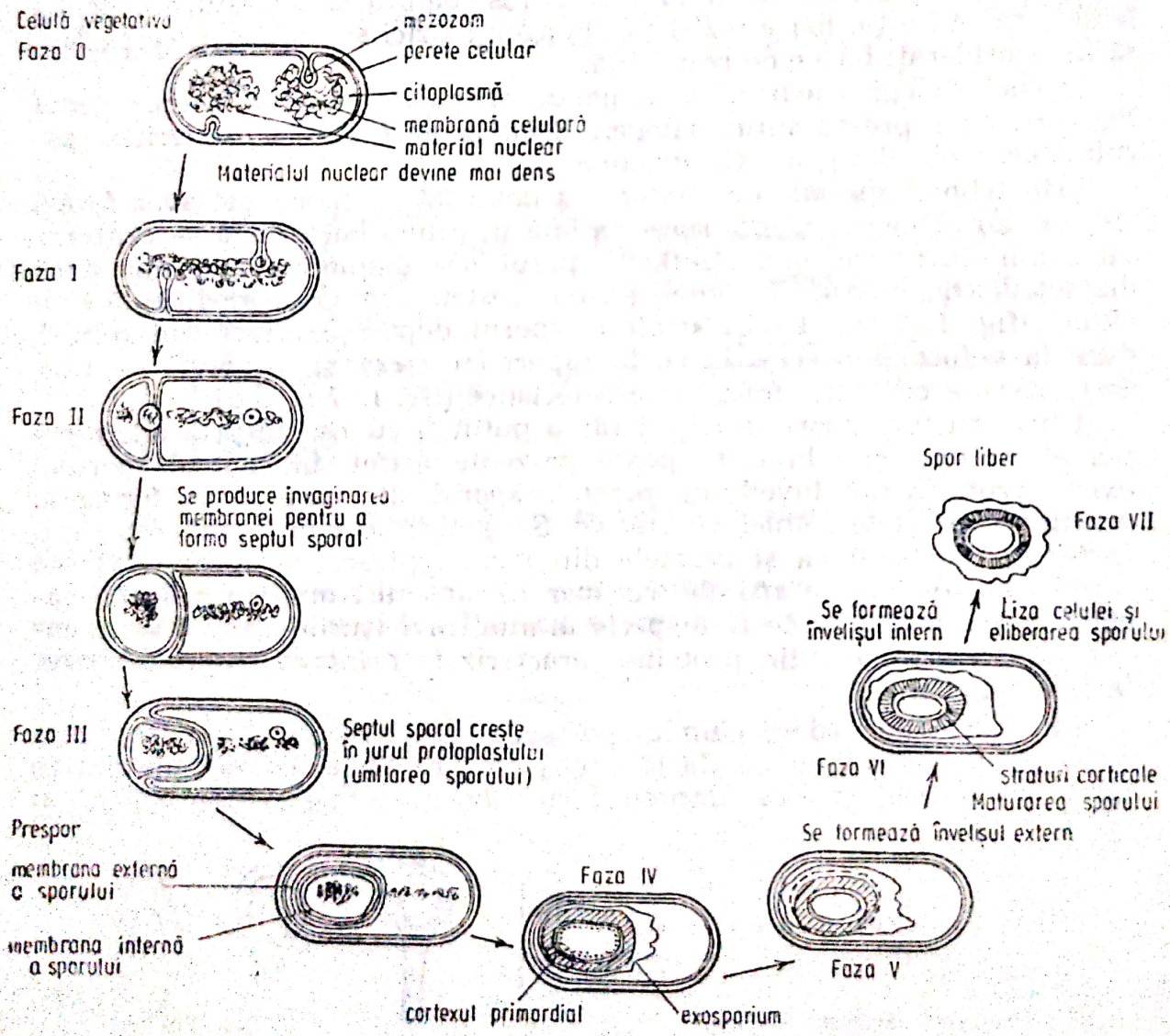


Fig. 1.19. **Schema fazelor sporulării.**

Scanned with OKEN Scanner

absența aproape completă a apei libere, el asigură termorezistența sporului. În rezistența la alți agenți fizici și chimici intervin bogăția de legături disulfhidrice din învelișurile sporale și impermeabilitatea sporului conferit de totalitatea învelișurilor, inclusiv de prezența a două unități de membrană.

Cantitatea redusă de apă și impermeabilitatea determină o lipsă aproape completă de activitate metabolică, sporul constituind o celulă dormantă, capabilă să se mențină în viață timp îndelungat, zeci și chiar sute de ani.

Sporularea în celula vegetativă se produce în mai multe faze care schematic pot fi înfățișate după cum se vede în figura 1.19, cu participarea mezozomilor și cu eliberarea, în final, a sporului prin liza celulei vegetative.

Dacă sporul ajunge în condiții favorabile de mediu se produce **germinarea:** o absorbție mare de apă, creșterea permeabilității, o eliminare de substanțe din interiorul sporului (mai ales dipicolinat de Ca) activează enzimele, inclusiv cele litice, avînd ca rezultat ruperea învelișurilor sporale; din protoplastul sporal se formează o nouă celulă vegetativă.

Sporularea este o *proprietate de specie,* constituind un criteriu morfologic util în identificarea bacteriilor. Proprietatea de rezistență, mai ales cea de termorezistență, a condus la fundamentarea științifică a regulilor de sterilizare și dezinfecție. Dezvoltarea endosporului în celula vegetativă reprezintă o formă primitivă de diferențiere celulară.

1.2.4. MECANISMUL COLORAȚIILOR GRAM ȘI ZIEHL-NEELSEN

Proprietatea de grampozitiv sau gramnegativ este direct dependentă de diferențele în organizarea structural-chimică a P. C., așa cum a rezultat din faptul că sferoplaștii și protoplaștii sînt uniform gramnegativi. Pentru proprietatea de gram este necesară de asemenea menținerea integrității P.C.

Coloratia Ziehl-Neelsen caracterizează proprietatea de acido-rezistență a mycobacteriilor (b. tuberculos) și se datorește organizării particulare a peretelui celular la aceste bacterii: bogat în lipide, dintre care acidul mycolic are rol esențial în acido-rezistență și structurarea în mai multe straturi a macromoleculelor în rețea fibrilară. Este, de asemenea, necesară integritatea structural-chimică a peretelui.

1.2.5. IMPORTANȚA PRACTICĂ A CUNOȘTINȚELOR DE MORFOLOGIE BACTERIANĂ

Importanța practică a cunoștințelor de morfologie bacteriană derivă din utilitatea acestora în diagnosticul de laborator direct în două etape principale:

— *examenul microscopic al preparatelor efectuate din produsul patologic,* care în cazul sifilisului sau leprei constituie singura modalitate practică de stabilire a diagnosticului etiologic. În alte infecții: gonoree, meningită meningococică, tuberculoză, pneumonie pneumococică, infecții

Scanned with OKEN Scanner

piogene streptococice şi stafilococice aduce informaţii care pot fixa diagnosticul. De asemenea orientează lucrările ulterioare de izolare şi identificare a agenţilor patogeni;

— o altă etapă, *identificarea bacteriei izolate*, care este iniţiată de cercetarea proprietăţilor morfo-tinctoriale.

1.3. METABOLISMUL BACTERIAN

1.3.1. DIVERSITATEA METABOLISMULUI BACTERIAN ÎN UNITATEA LUMII VII

Cunoaşterea şi înţelegerea metabolismului bacterian sînt facilitate de conceptul unităţii şi diversităţii de compoziţie chimică (pentru bacterii tabelul 1.6) şi de metabolism, existente în lumea vie.

Tabelul 1.6.

Compoziţia chimică a celulei de *E. coli* cu diviziune rapidă (după T. D. Brock)

Compuşii	Procentaj din greutatea totală	Masa moleculară medie	Nr. aproximativ de molecule pe celulă	Numărul diferitelor tipuri
H_2O	70	18	4×10^{10}	1
Ioni anorganici (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Cl^-, P_4^{4-}, SO_4^{2-} etc.)	1	40	$2{,}5 \times 10^8$	20
Carbohidraţi şi precursori	3	150	2×10^8	200
Aminoacizi şi precursori	0,4	120	3×10^7	100
Nucleotide şi precursori	0,4	300	$1{,}2 \times 10^7$	200
Lipide şi precursori	2	750	$2{,}5 \times 10^7$	50
Alte molecule mici (hem, chinone, produse din degradarea substanţelor nutritive etc.)	0,2	150	$1{,}5 \times 10^7$	250
Proteine	15	40.000	10^6	2000—3000
Acizi nucleici:				
ADN	1	$2{,}5 \times 10^9$	4	1
ARN:	6			
ARNr 16 S		500.000	3×10^4	1
ARNr 23 S		1.000.000	3×10^4	1
ARNt		25.000	4×10^5	60
ARNm		1.000.000	10^3	1000

* masa unei celule = 10^{-12} g

La microorganisme sînt întîlnite sub formă identică sau similară, principalele căi şi cicluri metabolice, care se găsesc şi la organismele superioare. Constituind un al treilea regn, Protistele au în acelaşi timp, o mare diversitate metabolică dacă avem în vedere numai faptul că metabolismul lor se extinde de la microorganisme complete biosintetic, asigurîndu-şi întregul material necesar creşterii şi multiplicării, pornind de la substanţele chimice simple, chiar anorganice, pînă la cele care sînt obligate la parazitarea celulei vii.

Scanned with OKEN Scanner

În această unitate și diversitate, se pot schița particularități care caracterizează metabolismul bacterian:

1. este un *metabolism unicelular*, desfășurîndu-se într-o singură celulă sau un singur tip de celulă;

2. este *necompartimentat* (lipsa organitelor celulare);

3. este un *metabolism teleonomic*, înțelegînd prin aceasta că în timpul evoluției au fost selectate acele căi metabolice și mecanisme de reglare care-i asigură eficiență maximă;

4. bacteriile au o *mare flexibilitate metabolică*, și de aici o capacitate crescută de adaptare rapidă la condiții foarte variate de mediu;

5. este un *metabolism de mare intensitate*, avînd ca rezultat o multiplicare extrem de rapidă (timp de generație 20 minute);

6. în complexitatea metabolică a lumii bacteriene operează *o restricție de ordin genetic*. Astfel la *E. coli*, ADN-ul cromozomial de $2{,}9 \times 10^9$ daltoni deține informație pentru sinteza a 3 000 tipuri de molecule proteice. Deci, întreg metabolismul este asigurat de intervenția a 1 500—2 000 enzime (restul proteinelor fiind structurale), ceea ce duce la concluzia că în scurt timp cel puțin la cîteva specii metabolismul va putea fi integral caracterizat treaptă de treaptă.

Diversitatea metabolică în raport de condițiile de mediu

a. **Temperatura.** Pentru dezvoltarea bacteriană este necesară o anumită temperatură, existînd (fig. 1.20) o temperatură optimă, minimă și maximă. În raport de temperatura optimă se disting bacterii *criofile* (psihrofile), *mezofile* și *termofile* (tabel 1.7.). Bacteriile care parazitează omul sînt mezofile pentru marea lor majoritate, cu temperatura optimă în jur de 37°.

b. Pentru majoritatea speciilor ***p*H-ul** optim este situat în zona neutralității (mici devieri sub sau peste $p\text{H} = 7$). Există însă specii care necesită un *p*H acid *(Lactobacillus)*, pînă la $p\text{H} = 2$ *(Thiobacillus)*: bacterii *acidofile*. Unele specii de vibrioni au un *p*H optim alcalin (*Vibrio cholerae*-*p*H = 9,2).

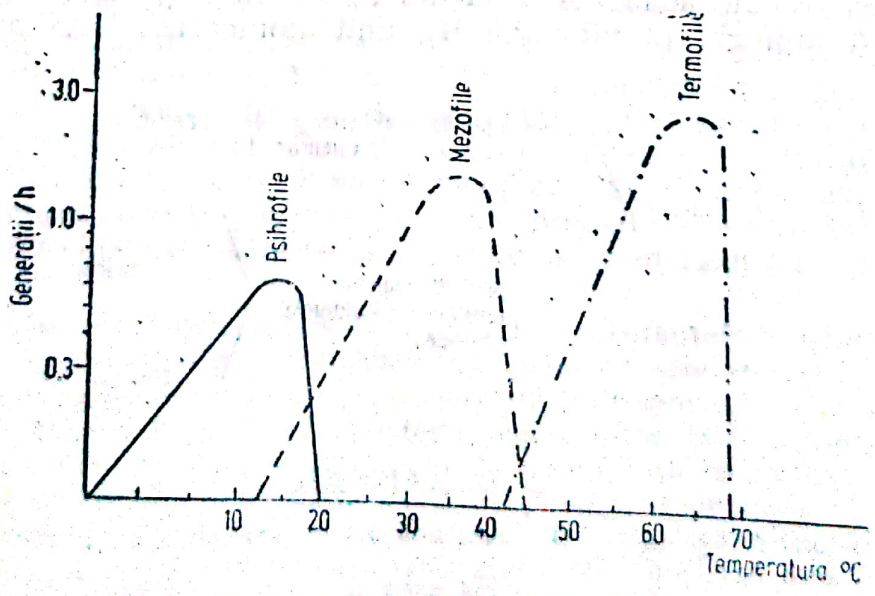


Fig. 1.20. **Condiționarea dezvoltării bacteriilor în funcție de temperatură** (după T.D. Brock).

Tabel 1.7

Gruparea bacteriilor în raport de temperatura optimă de dezvoltare

Grupa	Temperatura optimă	Limite de temperaturi în care se pot dezvolta	Habitate
Criofile	sub 15°	0°—20°	Zone polare, apele oceanelor, gheţari etc.
Mezofile	30°—45°	15°—45°	Distribuţie foarte largă, inclusiv organismul uman.
Termofile	55°—75°	Unele se pot dezvolta şi peste 75°	Soluri expuse puternic la soare, izvoare termale, composturi, ape de încălzire etc.

c. **Osmolaritatea.** Majoritatea bacteriilor sînt osmotolerante. Unele microorganisme necesită medii cu o concentraţie mare de Na (peste 3,5/NaCl) — bacterii *halofile,* cum este de exemplu, *Vibrio parahaemolyticus,* iar altele, *halotolerante* se pot dezvolta şi la concentraţii mari de NaCl pe lîngă cele obişnuite, de exemplu, *Staphylococcus.*

d. **Necesităţi nutritive.** Se înţelege prin nutriţie bacteriană modalităţile prin care bacteriile utilizează substanţele şi factorii de mediu pentru creştere şi multiplicare. Necesităţile nutritive s-au putut stabili prin utilizarea mediilor sintetice. S-au conturat astfel tipuri principale de nutriţie pe baza a două criterii importante (fig. 1.21): sursa de energie — tipul *fototrof* şi tipul *chimiotrof* şi sursa de carbon necesar construirii materialului celular — bacterii *autotrofe, mixotrofe* şi *heterotrofe.* Bacteriile care parazitează organismul uman sînt bacterii *heterotrofe, chimioorganotrofe, mezofile, osmotolerante.* Acestea, în raport cu alte necesităţi nutritive, pot fi grupate astfel: 1. bacterii ce pot utiliza azotul anorganic, dezvoltîndu-se pe un mediu minimal cu un compus simplu ca sursă de carbon (de exemplu, glucoza) şi azot anorganic (tabel 1.8); 2. bacterii care necesită N aminic; 3. bacterii care au nevoie şi de factori de creştere, reprezentaţi de substanţe pe care acestea nu şi le pot sintetiza şi de aceea trebuie adăugate la mediu în cantităţi de aprox. 20 μg/ml: vitamine (complexul B, vitamina K), unii aminoacizi, baze purinice şi

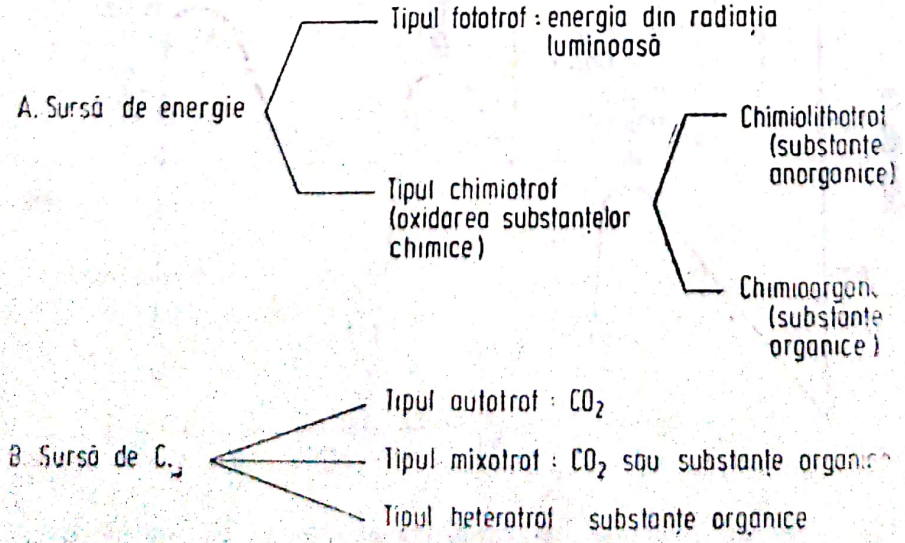


Fig. 1.21. Tipuri de nutriţie la bacterii.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.8

Compoziția unui mediu sintetic

KH_2PO_4	6,1	g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	12,5	g
$(NH_4)_2SO_4$	2,0	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	g
$CaCl_2$	0,005	g
Glucoză	5,0	g
Apă distilată	1000	ml

pirimidinice, nucleotide etc. Pentru genul *Haemophylus,* sîngele aduce în mediu doi factori: hematina și NAD-ul, NADP.

Variația prototrof-auxotrof. Multe populații (tulpini) bacteriene sălbatice (izolate din natură) se dezvoltă pe medii minimale: bacterii *prototrofe.* Din acestea pot să apară variante (mutante) care necesită factori de creștere, ce reprezintă markeri utili în analiza genetică: *auxotrofe.*

Bacteriile paratrofe sînt cele care nu se dezvoltă decît pe celula vie, fiind obligate la parazitismul acesteia.

1.3.2. CATABOLISM, ANABOLISM, METABOLISM BIOENERGETIC

În organismele vii, deci și la microorganisme, se produc reacții biochimice care se diferențiază în mod obișnuit în **catabolism,** proces de degradarea substanțelor nutritive transportate din mediu în celulă, și **anabolism,** proces ce asigură sinteza structurilor celulare. Reacțiile catabolice se desfășoară de obicei într-o singură direcție, mai ales pe căi sau cicluri metabolice principale — magistralele metabolice, întîlnite în toată lumea vie (glicoza, ciclul acizilor tricarboxilici, șuntul pentozo-fosfatic, beta-oxidarea acizilor grași etc.) și sînt însoțite sau sînt puncte de inițiere a eliberării energiei. Moleculele supuse catabolismului sînt într-o primă etapă modificate pe cale enzimatică, în așa fel încît scheletul lor carbonic sau produși rezultați din ele, sînt introduși în căile metabolice principale.

Reacțiile anabolice au loc cu consum de energie (endergonice) pe căi sau secvențe de reacții diferite de cele catabolice și specifice pentru diferitele tipuri de molecule. Pentru a asigura creșterea și multiplicarea celulară, între cele două direcții ale metabolismului, trebuie să existe o echilibrare strînsă, avînd în vedere că celula procariotă este necompartimentată, echilibru în care eliberarea și conservarea energiei au o poziție centrală.

Metabolismul bioenergetic. Energia din substanțele organice folosite de bacteriile heterotrofe se eliberează prin procese de oxido-reducere, care în acest caz echivalează cu donare de hidrogen (e^- și H^+) și acceptare de hidrogen (e^- și H^+). Transferul electronilor de pe substratul donator pe cel acceptor se face dependent de potențialul redox (fig. 1.22). Deoarece electronii nu pot exista decît ca părți a unor molecule, intervin transportorii de electroni. Ei pot fi legați de membrană (lanțul respirator celular) sau transportori liberi, NAD și NADP fiind cei mai importanți.

1. *Principalele tipuri de eliberare a energiei la bacterii* sînt caracterizate în raport cu substratul donator și acceptorul final de H_2, astfel:

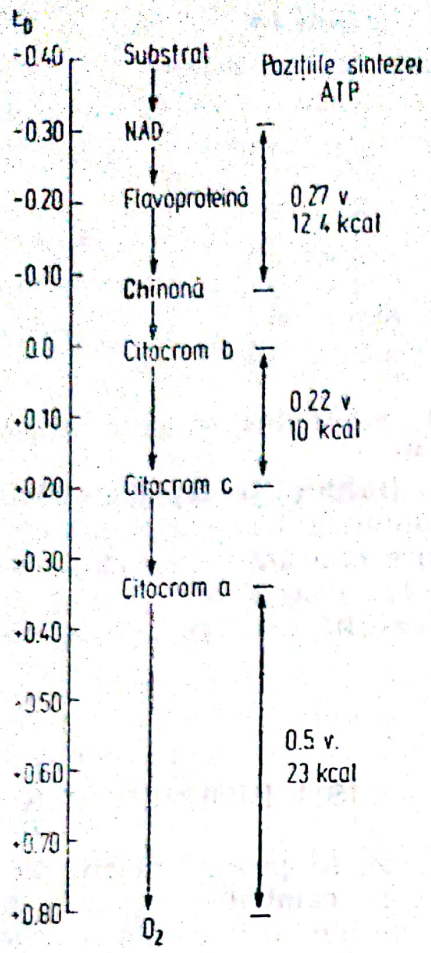


Fig. 1.22. **Sistemul complet de transport de electroni care asigură transferul electronilor de la substrat la O_2.** Sînt de asemenea fixate poziţiile în care are loc sinteza ATP-ului.

— *respiraţie,* uneori numită şi respiraţie oxibiotică, în care donorul de H este o substanţă organică, iar acceptorul final O_2, transferul de electroni făcîndu-se prin lanţul respirator;

— *respiraţie anaerobă:* donorul este o substanţă organică, iar acceptorul o substanţă anorganică, diferită de O_2, ca nitrat, nitrit, sulfat, carbonat, transferul de electroni făcîndu-se de asemenea prin lanţul respirator;

— *fermentaţia* constă în procese de oxido-reducere care realizează numai o oxidare parţială a substratului, donorul şi acceptorul de H_2, fiind substanţe organice. În procesele de fermentaţie (ca exemplu, calea glicolizei Embden-Meyerhoff), printr-o rearanjare structurală a atomilor se ajunge de la un substrat mai redus la o moleculă mai oxidată. Fermentaţia se poate desfăşura şi în prezenţa oxigenului, dar fără intervenţia acestuia.

În raport de utilizarea acestor tipuri de eliberare a energiei şi de relaţia cu oxigenul din mediu, bacteriile pot fi grupate în: bacterii *strict aerobe, strict anaerobe, aerob-anaerob facultative, microaerofile, anaerobe aerotolerante* (tabelul 1.9.)

2. *Conservarea energiei.* O parte din energia eliberată prin oxido-reducere se pierde sub formă de căldură sau este utilizată direct pentru unele funcţii celulare (transport, mobilitate ciliară etc.). Pentru viaţa celulară

Tabel 1.9

Gruparea bacteriilor în raport cu procesele de eliberare a energiei şi relaţia cu oxigenul din mediu

Grupa	Eliberarea energiei	Oxigen în mediu	Exemple
Strict aerobe*	Respiraţie	Prezenţa obligatorie	Mycobacterium, Bacillus, Pseudomonas
Strict anaerobe	Fermentaţie	Obligator absent (Este toxic	Clostridium, Bacteroides, Fusobacterium, Peptostreptococcus etc.
Aerob-anaerob* facultative	Respiraţie sau fermentaţie	Prezenţa** facultativă	Multe din bacteriile umane
Microaerofile	Respiraţie sau fermentaţie	Tensiune scăzută a oxigenului atmosferic cu 5—20% CO_2	Neisseria, Brucella abortus, Campylobacter
Anaerobe aerotolerante	Fermentaţie	Prezent sau absent	Streptococcus

* Unele specii pot utiliza respiraţia anaerobă
** Se dezvoltă mai bine dacă mediul conţine oxigen

Scanned with OKEN Scanner

este important ca energia să fie conservată în legături bogate în energie în primul rînd ATP. Sînt recunoscute ca grupări macroergice cele care la hidroliză eliberează o cantitate de energie mai negativă de 7 Kcal/mol, cunoscută fiind poziția unică a ATP-ului în scara termodinamică din tabelul 1.10.

Tabel 1.10

Compuși cu legături esterice fosfatice, bogate în energie

Compusul	kcal/mol
Fosfoenolpiruvat	—14,8
1-3-Difosfoglicerat	—11,8
Acetilofosfat	—10,1
ATP	— 7,3
Glucozo-1-fosfat	— 5,0
Fructozo-6-fosfat	— 3,8
AMP	— 3,4
Glucozo-6-fosfat	— 3,3

Sinteza ATP-ului se face prin două mecanisme principale: fosforilare prin transport de electroni și fosforilare la substrat.

a. *Fosforilare prin transport de electroni.* În respirație, perechile de electroni și protoni cedate de substratul oxidat sînt transportate la acceptorul final (O_2) prin *lanțul respirator* sau *lanțul transportor de electroni,* la bacterii fiind similar organizat cu cel din mitocondrii cu excepția că este structurat în membrana celulară (v. fig. 1.22, 1.23). Așa cum se cunoaște în trei poziții din lanțul respirator între NAD și flavoproteină, între citocromul b și c și între citocromul a și O_2 se eliberează cantități mari de energie ce se conservă prin sinteza de ATP. Lanțul transportor funcționează de asemenea în respirația anaerobă, acceptorul de electroni fiind diferit de O_2 (nitrat, nitrit, sulfat etc.), cu mențiunea că sinteza ATP are loc numai în primele două poziții. Datorită respirației anaerobe se consideră mai adecvat termenul de *fosforilare prin transport de electroni* decît cel de fosforilare oxidativă.

Mecanismul prin care are loc sinteza ATP-ului constă în formarea așa-numitei *„forțe proton motrice"*. Transferul separat al electronilor și protonilor prin buclele lanțului realizează o concentrare diferită a acestora pe cele două fețe ale membranei. Se creează astfel un gradient de *pH* și potențial electric care duc la o stare „energizată" a membranei. Gradientul de protoni prin interacțiune cu ATP-aza favorizează utilizarea energiei în direcția sintezei ATP-ului.

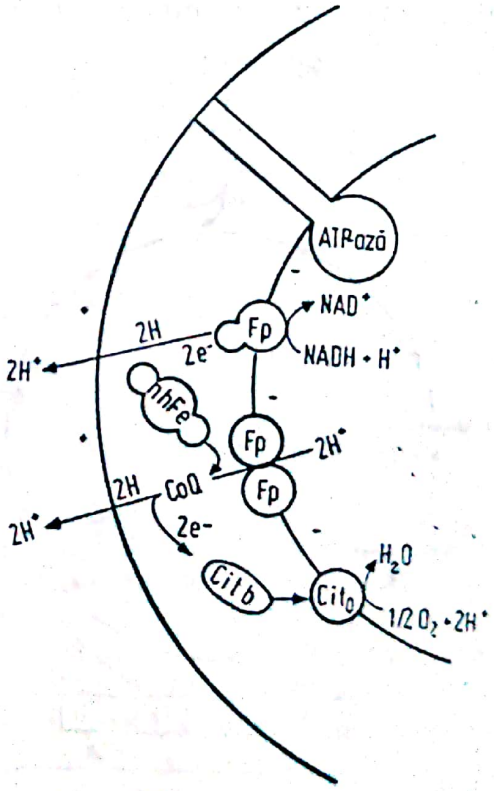


Fig. 1.23. **Structurarea și orientarea sistemului de transport în membrana bacteriană, luînd ca model *E. coli*.** Transportul de electroni prin buclele respiratorii, formate între cele două fețe ale membranei, duce la separarea și eliberarea H^+ pe fața externă a membranei. Lipsește citocromul c (după T. D. Brock).

Scanned with OKEN Scanner

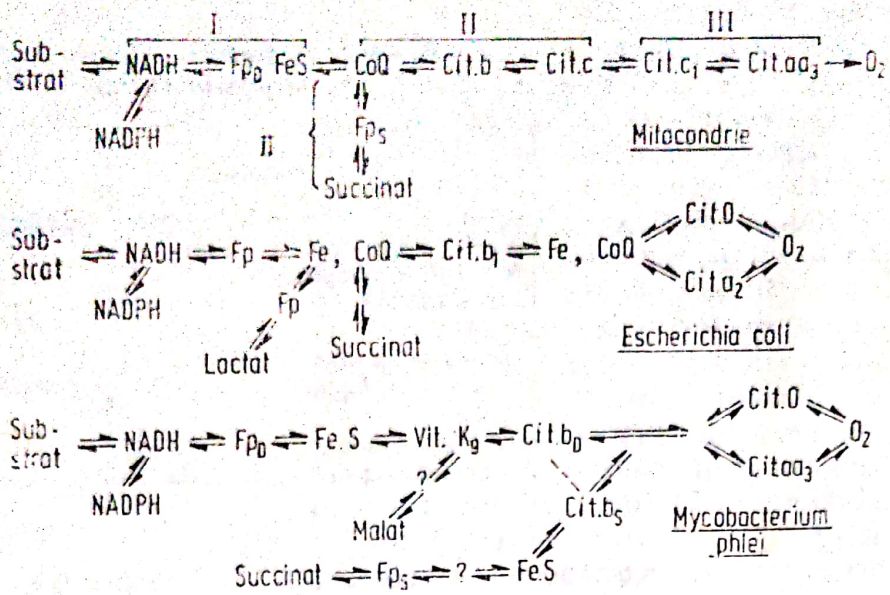


Fig. 1.24. Lanțul respirator din mitocondrie și bacterii:
Fp — flavoprotine; Fp_D — flavoproteine din sistemul NADH — oxidazic; Fp_S — flavoproteine din sistemul succinoxidazic; CoQ — coenzime Q; FeS — fier neheminic.

Față de mitocondrie, lanțul respirator la bacterii are unele particularități: la multe specii el se prezintă ramificat, constînd din cîteva ramuri distincte care comunică între ele în anumite poziții (fig. 1.24). Bacteriile au tendința de a produce variante și hibrizi de citocromi sau citocromi particulari ce nu se găsesc la alte organisme. De asemenea este posibilă fosforilarea prin funcționarea unui lanț incomplet.

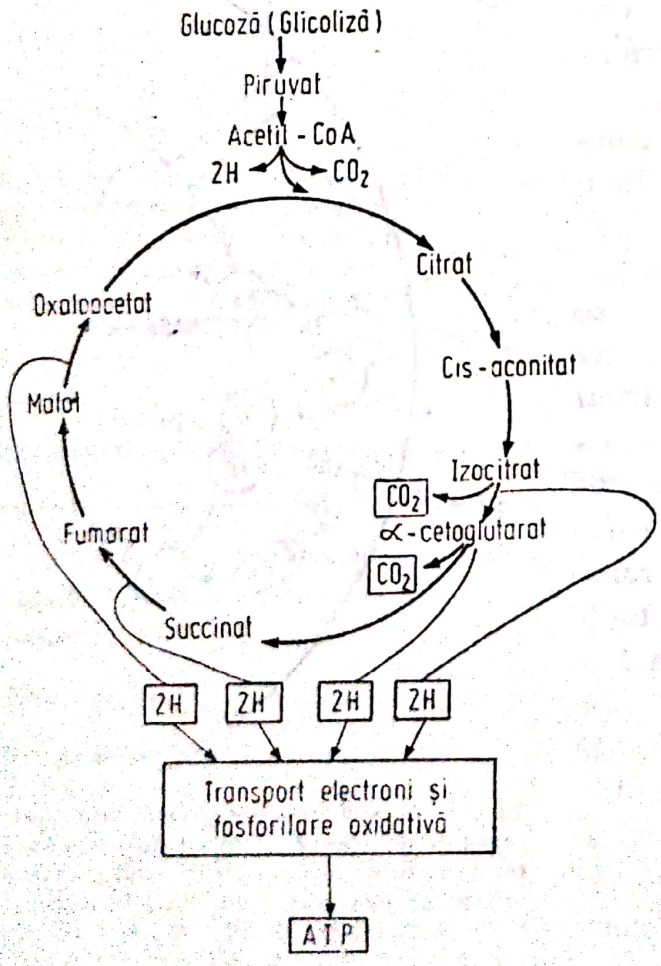


Fig. 1.25. Cuplarea glicolizei cu ciclul acizilor tricarboxilici și fosforilarea în lanțul respirator.

Prin cuplarea glicolizei cu ciclul acizilor tricarboxilici (CAT) și fosorilarea în lanțul respirator, compușii organici, ca de exemplu, glucoza pot fi oxidați complet la CO_2 cu formare de H_2O și eliberarea unei mari cantități de energie (fig. 25).

b. *Fosforilarea la substrat.* ATP-ul este sintetizat direct datorită unor reacții enzimatice care asigură oxidarea sursei de energie, cu formarea unei legături macroergice și transferarea energiei în ATP.

1. O astfel de fosforilare are loc în CAT prin oxidarea cetoglutaratului la succinat, avînd ca intermediar succinil-CoA.

2. *Fermentarea glucozei* este principalul proces de elibera-

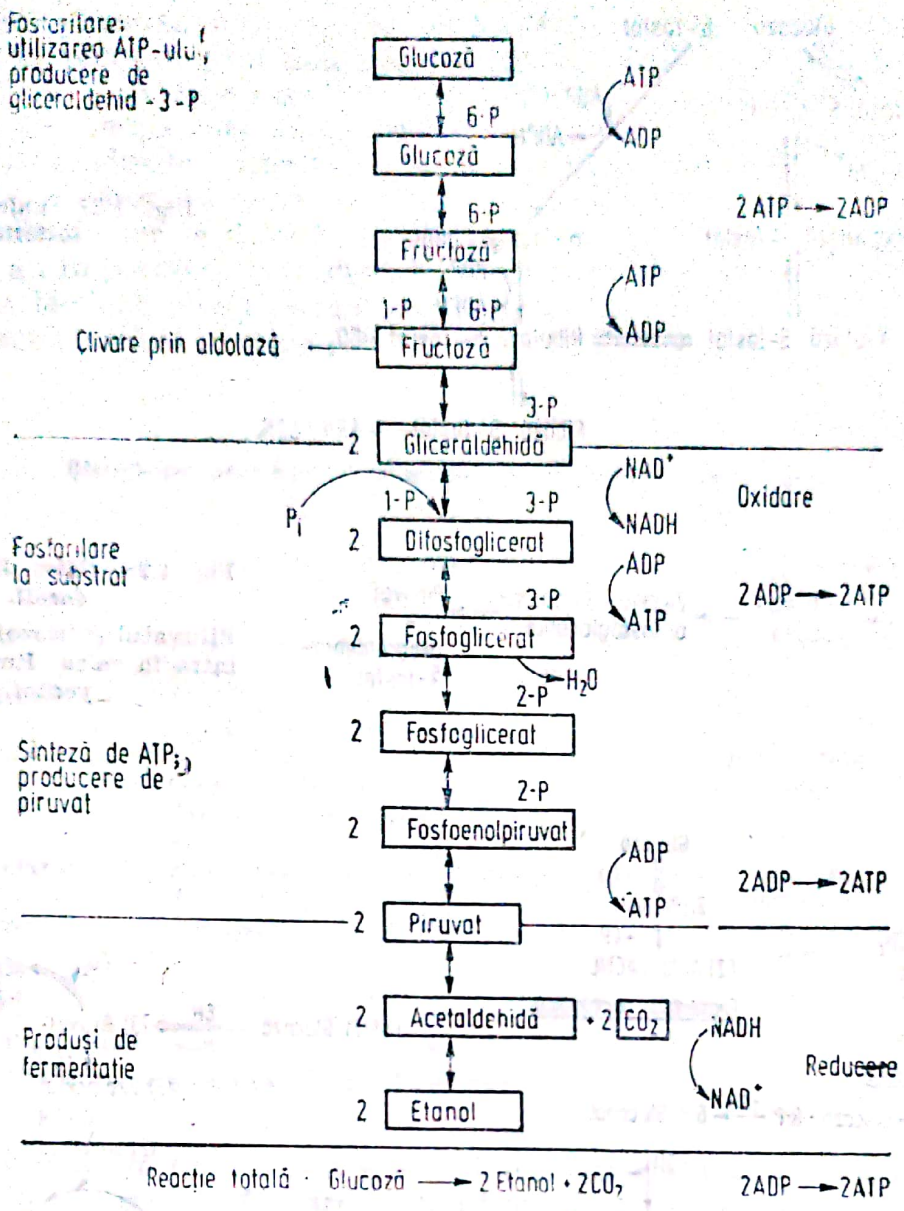


Fig. 1.26. Fermentarea glucozei la alcool și CO_2.
Treptele de la glucoză la piruvat formează calea Embden—Meyerhof sau glicoliza.

re și conservare de energie la bacterii, ce se dezvoltă în anaerobioză; aceasta are loc prin glicoliză sau calea Embden- Meyerhof (fig. 1.26), în care printr-o oxidare parțială a glucozei se sintetizează ATP-ul prin fosforilare la substrat în două poziții: prin oxidarea aldehidei 3-fosfoglicerice la acid 1—3 difosfogliceric și prin cedarea energiei din fosfoenolpiruvat.

Alte monozaharide, hexoze și pentoze, sînt metabolizate prin conversiunea lor în unul din compușii întîlniți în glicoliză, așa cum se realizează prin calea pentozo-fosfatică (fig. 1.27) sau calea Entner-Doudoroff (fig. 1.28).

Produsul final al glicolizei este piruvatul, producîndu-se în același timp și reducerea NAD-ului, care este aici unicul acceptor de electroni. Deoarece celula are disponibilă o cantitate limitată de NAD, pentru asigurarea funcționării glicolizei este necesară o aprovizionare continuă cu forma oxidată a nucleotidului. Aceasta se realizează în ultima parte a

Scanned with OKEN Scanner

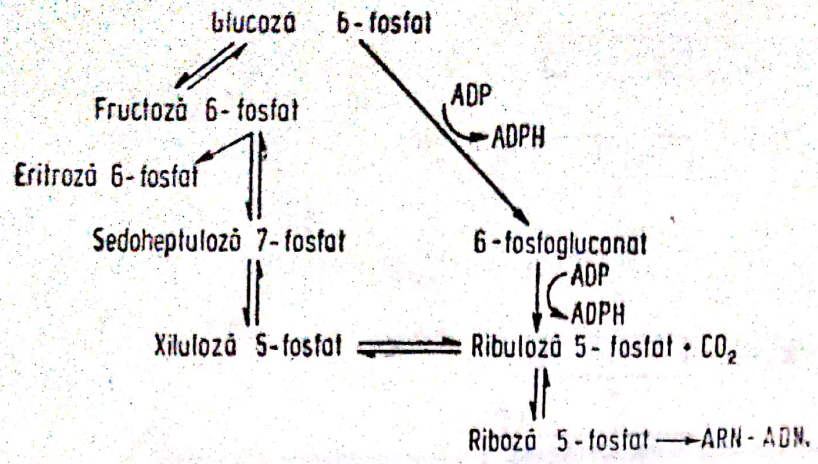


Fig. 1.27. **Calea pentozofosfatică.**

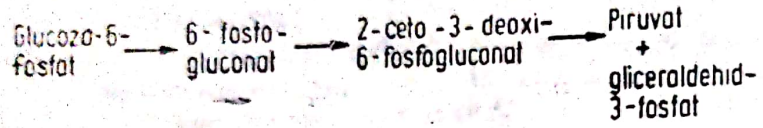


Fig. 1.28. **Calea Entner-Doudoroff.**

Piruvatul şi triozofosfatul pot intra în calea Embden—Meyerhof.

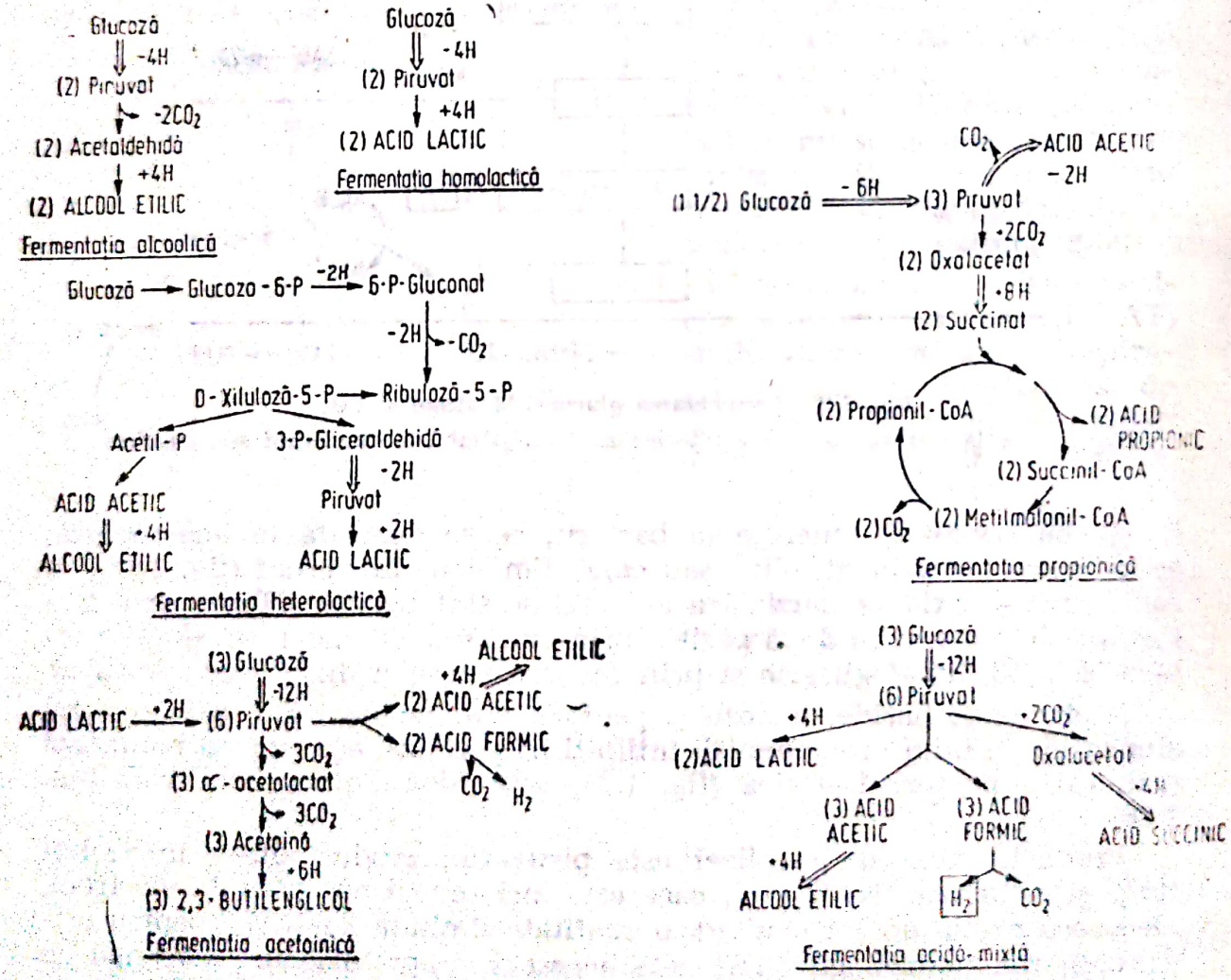


Fig. 1.29. **Tipuri principale de fermentaţie la bacterii.**

Scanned with OKEN Scanner

degradării glucozei, fermentarea propriu-zisă (v. fig. 1.26), în care, pornind de la piruvat, prin una sau mai multe reacții, are loc o reducere a acestuia, cu o oxidare concomitentă a NADH-ului. Se ajunge în final la produși de reacție care sînt eliminați în mediu și, corespunzător produsului sau produșilor acumulați, se conturează: *tipuri principale de fermentație*, a căror secvență specifică de reacții se găsește în figura 1,29, iar distribuția lor la diferite specii bacteriene în tabelul 1.11. Unele din acestea au importanță în industria alimentară (fermentația alcoolică, fermentația lactică), altele pentru identificarea bacteriană (fermentația acidă mixtă, acetoinică și propionică).

Tabel 1.11

Distribuția principalelor tipuri de fermentație la microorganisme

Tipul de fermentație	Microorganisme	Produșii
Alcoolică	Fungi (*Saccharomyces*) Puține bacterii din *Zimmomonas*	Alcool etilic, CO_2
Homolactică	*Streptococcus* *Lactobacillus* (unele specii)	Acid lactic
Propionică	*Clostridium propionicum*, *Corynebacterium diphtheriae*, Specii din genurile *Neisseria* și *Veillonella*	Acid propionic, acid acetic, acid succinic, CO_2
Acidă mixtă*	*Enterobacteriaceae* (exceptînd tribul *Klebsielleae*)	Acid succinic, acid acetic, acid formic, CO_2 și H_2
Acetoinică**	*Klebsielleae*, *Aeromonas*	Acetoină, 2-3-butilenglicol, alcool etilic etc.

* Evidențiabil prin testul roșu metil.

** Evidențiabil prin testul Voges-Proskauer.

3. *Reacția fosforoclastică* este întîlnită la anaerobi cu sinteză de ATP, de asemenea prin fosforilare la substrat, printr-o secvență de reacții (figura 1.30). În această reacție intervin ca acceptori de H, feredoxinele (proteine cu fier neheminic), care funcționează la potențial redox foarte coborît, apropiat de cel al electrodului de H.

Piruvat + CoA ⟶ Acetil - CoA + CO_2 + H_2

Acetil - CoA + PO_4^{3-} ⟶ Acetil - Fosfat + CoA

Acetil - Fosfat + ADP ⟶ Acetat + ATP

Fig. 1.30. **Reacția fosforoclastică.**

Bilanțul energetic comparativ în fermentație și fosforilare prin transport de electroni arată că fermentația este un proces primitiv de eliberare a energiei, întîlnit la bacteriile anaerobe care au apărut primele, în condițiile în care atmosfera pămîntului era lipsită de oxigen. După apariția oxigenului s-au dezvoltat procesele fosforilării oxidative. Din tabelul 1.12 reiese că în glicoliză, dintr-un mol de glucoză, se sintetizează doi moli ATP, pe cînd prin respirație, prin activitatea coordonată a glicolizei, CAT și lanțului respirator, rezultă 38 moli ATP.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.12

Producerea de ATP prin oxidarea anaerobă şi aerobă a glucozei

Bacterii	Glicoliză	C.A.T.	Total
Strict anaerobe	2 ATP	Nu	*2 ATP*
Strict aerobe	2 ATP(FS)*	2 ATP(FS)*	
	6 ATP (fosforilare** oxidativă)	28 ATP (fosforilare oxidativă)	*38 ATP*

* FS = fosforilare la substrat
** Oxidarea NADH produs în cursul glicolizei prin fosforilare în lanţul respirator

1.3.3. DE LA CATABOLISM LA BIOSINTEZA MATERIALULUI CELULAR

Reacţiile catabolice duc la eliberarea energiei şi conservarea ei în legături macroergice, în special ATP. Totodată principalele căi metabolice generează produşi intermediari sau finali cu rol cheie în iniţierea altor căi metabolice şi mai ales, în biosinteză, găsindu-se de aceea la intersecţia dintre catabolism şi anabolism (tabel 1.13). Rezultă de aici că la bacterii principalele căi metabolice sînt *amfibolice,* ceea ce semnifică că ele intervin nu numai în catabolism, dar furnizează compuşi C_2—C_6 utili în procesele de biosinteză. La procariote, chiar şi în condiţii de mediu obişnuite, porţiunile centrale ale ciclurilor metabolice sînt dirijate în sens biosintetic. Mai mult încă, există la bacterii *căi anaplerotice* care duc la fixarea

Tabel 1.13

Produşi intermediari între catabolism şi anabolism

Produsul intermediar	Originea catabolică	Rol în biosinteză
Glucozo-1-fosfat	Degradarea polizaharidelor şi galactozei	Nucleozide cuplate cu monozaharide
Glucozo-6-fosfat	Glicoliză	Pentoză, polizaharide de rezervă
Ribozo-5-fosfat	Calea pentozofosfatică	Nucleotide, dezoxiribonucleotide
Eritrozo-5-fosfat	Calea pentozofosfatică	Aminoacizi aromatici
Fosfoenolpiruvat	Glicoliză	Sisteme de transport, fosfotransferaze, aminoacizi aromatici, sinteza acidului acetil-muramic
Piruvat	Glicoliză	Alanină, valină, leucină, fixare de CO_2 (căi anaplerotice)
Acid 3-fosfogliceric	Glicoliză	Serină, glicină, cisteină
Acid α-cetoglutaric	CAT	Acid glutamic, prolină, arginină, lizină
Succinil-CoA	CAT	Metionină, porfirină
Oxalacetat	CAT	Acid aspartic, lizină, metionină, treonină, izoleucină
	Ciclul glioxilic	
Dihidroxiacetonofosfat	Glicoliză	Glicerol, lipide, fosfolipide
Acetil-CoA	Decarboxilarea piruvatului, β-oxidare, degradarea pirimidinelor	Acizi graşi, steroli, lizină, leucină

Scanned with OKEN Scanner

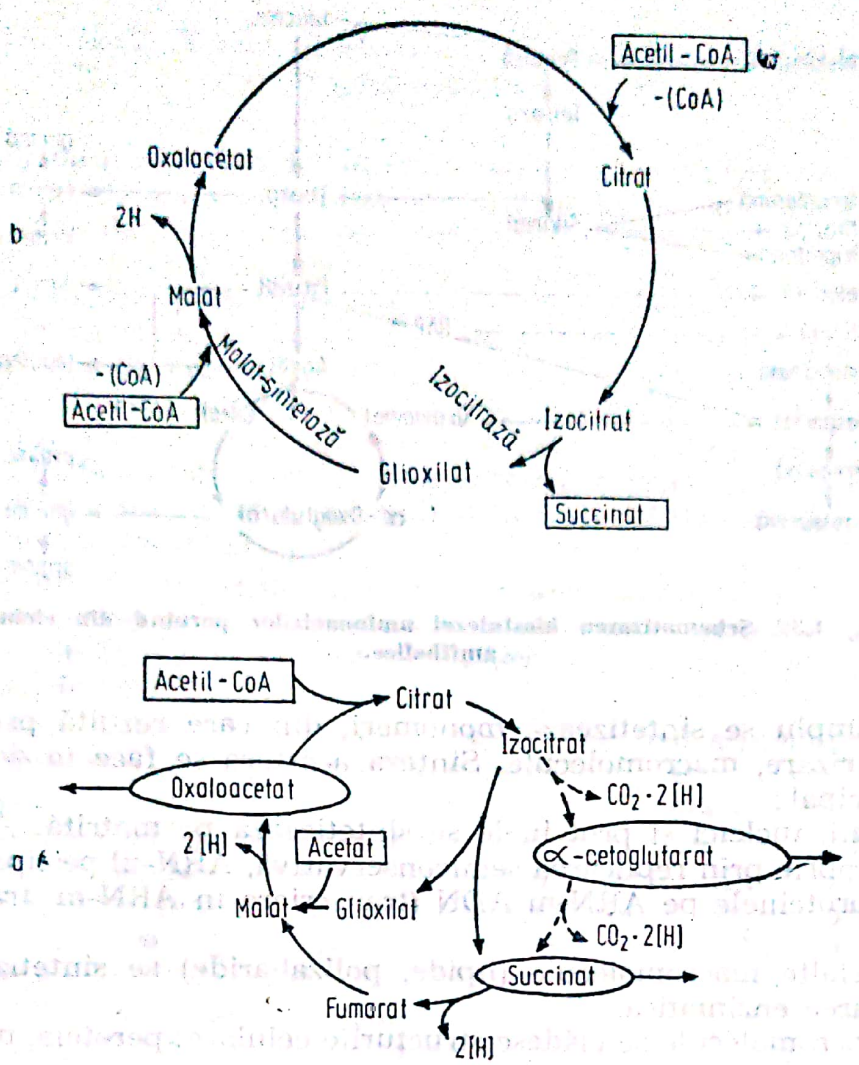


Fig. 1.31. Ciclul glioxilic (*a*) şi integrarea funcţională cu ciclul acizilor tricarboxilici (*b*).

CO_2 şi asigurarea sintezei de compuşi C_3 şi C_4, necesari anabolismului. Una din acestea constă în fixarea CO_2 la acetil-CoA cu intervenţia feredoxinelor, rezultînd acid piruvic, cu funcţia metabolică importantă cunoscută. Apoi, la bacteriile care se dezvoltă pe acetat ca singură sursă de C, se realizează din acesta sinteza oxalacetatului prin *ciclul glioxilic* conexat cu CAT. Această cale anaplerotică, chiar şi în condiţii obişnuite de mediu, aprovizionează celula cu oxalacetat, folosit în procesele de biosinteză, şi menţine astfel funcţionalitatea CAT (vezi fig. 1.31).

Multe specii bacteriene sînt capabile să-şi sintetizeze întreg lotul de aminoacizi ce intră în sinteza proteinelor, folosind intermediari din căile amfibolice (fig. 1.32) şi fixînd pe lanţul carbonic al acestora ionul amoniu. Unele bacterii pot utiliza azotul din nitrat şi nitrit, pe care îl reduc la amoniu, după cum puţine bacterii pot fixa azotul atmosferic, de asemenea prin reducerea acestuia la amoniac (bacterii fixatoare de azot care formează sisteme simbiotice cu leguminoasele, sau bacterii libere).

Devine astfel posibil să înţelegem modalităţile prin care bacteriile îşi sintetizează întregul material necesar creşterii celulei de la un compus simplu (glucoză), care sînt prezentate în figura 1.33. Dintr-un compus

Scanned with OKEN Scanner

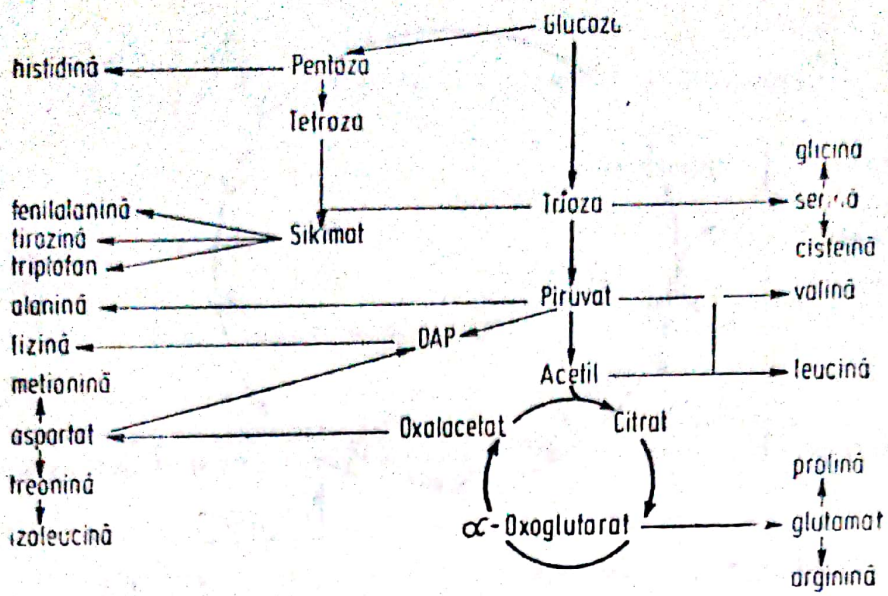


Fig. 1.32. Schematizarea biosintezei aminoacizilor pornind din ciclurile amfibolice.

organic simplu se sintetizează monomeri, din care rezultă prin procese de polimerizare, macromolecule. Sinteza acestora se face în două modalități principale:

— acizii nucleici și proteinele se sintetizează pe matriță: ADN-ul pe matrița proprie prin replicarea semiconservativă, ARN-ul pe tiparul ADN-ului, iar proteinele pe ARN-m/ADN (transcriere în ARN-m, traducere în proteine);

— celelalte macromolecule (lipide, polizaharide) se sintetizează prin polimerizarea enzimatică.

Din macromolecule se clădesc structurile celulare: peretele, membrana, ribozomii etc.

Pentru a se asigura un flux metabolic echilibrat de la catabolism la biosinteză, prin căile amfibolice și produșii din intersecțiile metabolice, cu rezultat final, creșterea și diviziunea celulară, intervin mecanisme complexe de reglare, care pot fi astfel grupate:

1. pătrunderea în celulă a substanțelor nutritive, asigurată de funcția de membrană selectivă a membranei citoplasmatice prin sistemele de transport facilitat și transport activ;
2. controlul genetic al biosintezei enzimelor, prin controlul negativ (represie și inducție), represie catabolică și prin control pozitiv;
3. controlul activității enzimelor prin retroinhibiție (control alosteric).

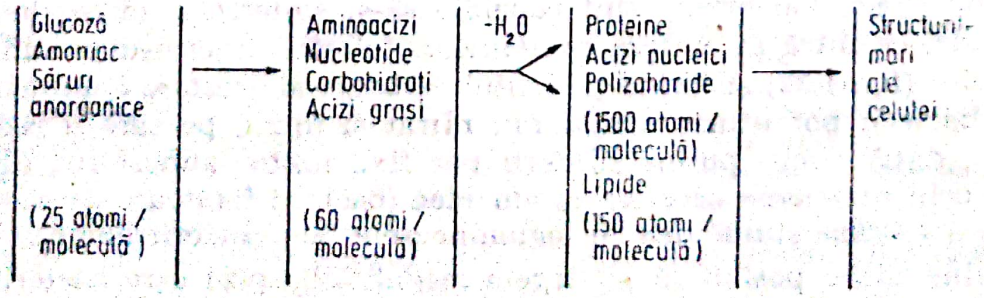


Fig. 1.33. Schematizarea biosintezei materialului celular pornind de la compuși simpli (după Stent).

Scanned with OKEN Scanner

1.3.4. CREŞTEREA ŞI MULTIPLICAREA BACTERIILOR. CURBA DE DEZVOLTARE

Metabolismul bacterian de tip teleonomic realizează prin mecanisme de reglare o aprovizionare continuă şi echilibrată cu structurile chimice, de la cele mai simple la cele mai complexe, pentru asigurarea vieţii celulei. Celula are doar două alternative — fie creşterea şi diviziunea ei, asigurînd perpetuarea speciei căreia aparţine, fie moartea.

Bacteriile ca structuri unicelulare procariote, spre deosebire de formele superioare de organisme vii, nu au cicluri obligatorii de viaţă, care duc la diferenţierea celulară. Procariotele se reproduc continuu ca celule identice, cu modificări caracteristice în perioada de diviziune.

În condiţii favorabile, dezvoltarea bacteriilor poate fi restrînsă la analiza unei celule sau la studiul populaţiilor de celule similare care constituie *cultura microbiană.*

Dacă se urmăreşte celula, are loc o *creştere* continuă pînă ce toţi constituienţii ei ajung în cantitate dublă. Aceasta este urmată de înmulţirea celulei, care se face prin **diviziune celulară,** prin sciziparitate sau fiziune binară, rezultînd două celule identice.

La culturi în faza S, diviziunea are loc printr-o strangulare pe diametrul transversal, strangularea membranei citoplasmatice fiind urmată de cea a peretelui celular, pînă la separarea celor două celule fiice. Fiecare din acestea au cantităţi egale din fiecare compus al celulei. Pentru culturile R se formează un sept transversal complet din membrana citoplasmatică şi apoi, într-o fază ulterioară, celulele se despart prin apariţia peretelui celular şi septul format de membrana citoplasmatică. Evenimentele ce au loc între cele două diviziuni celulare constituie **ciclul celular.** Ele sînt coordonate de replicarea moleculei de ADN, cu care se iniţiază ciclul celular şi prin care se coordonează sinteza şi activitatea enzimelor. Este de aceea posibil ca fals să apară celule cu două şi chiar patru echivalenţi nucleari, deoarece formarea septului de separare a celulelor este întîrziat faţă de replicarea ADN-ului.

O celulă ajunsă într-un mediu favorabil se înmulţeşte pentru a da naştere unei culturi microbiene. Această înmulţire poate fi urmărită în special în medii lichide şi apreciată prin:

a. *determinarea numărului de celule bacteriene pe unitate de volum.* Totalul celulelor (vii şi moarte) poate fi calculat prin numărarea directă în camere de numărare (asemănătoare cu cele folosite în stabilirea numărului de hematii). Numărul celulelor viabile se determină prin însămînţarea unui volum de cultură pe suprafaţa unui mediu solid. Numărul coloniilor dezvoltate exprimă numărul celulelor vii, ştiut fiind că o colonie (clonă deci) are la origine o singură celulă;

b. *densitatea celulară (masa bacteriană)* care se realizează prin mai multe tehnici: calcularea greutăţii uscate a bacteriilor, măsurarea azotului sau a proteinelor din celulele dintr-un volum dat. Cea mai obişnuită metodă o constituie stabilirea *densităţii optice* cu ajutorul fotometrelor prin absorbţia luminii la o anumită lungime de undă, metodă care are avantajul că poate înregistra continuu înmulţirea bacteriilor.

Dezvoltarea în timp a unei culturi în mediu lichid prin stabilirea la intervale de timp egale a numărului de celule vii sau a densităţii celulare (mai ales, a densităţii optice) poate fi înregistrată sub forma aşa-nu-

Scanned with OKEN Scanner

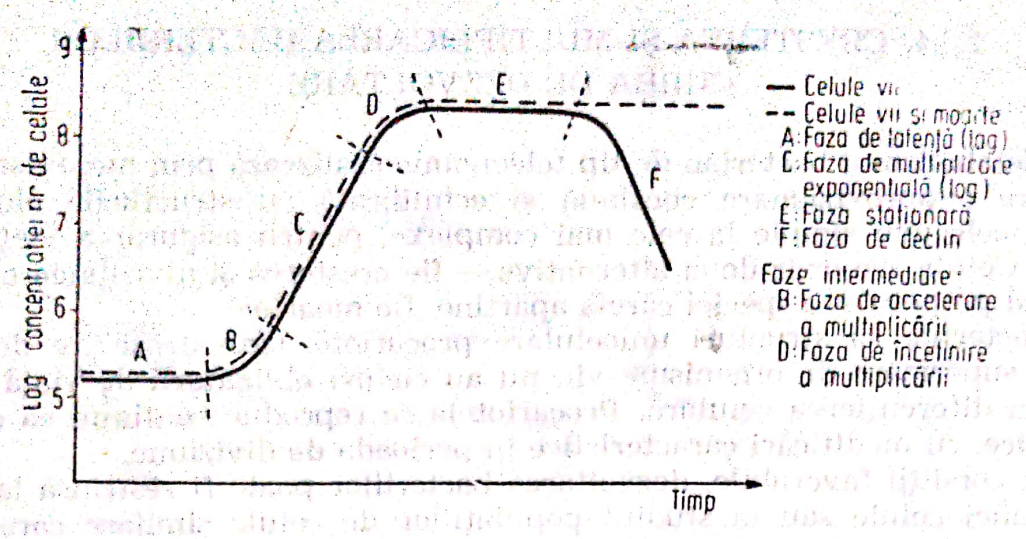


Fig. 1.34. Curba de dezvoltare a unei culturi bacteriene.

mitei **curbe de dezvoltare a culturii bacteriene.** Această curbă este construită sub formă semilogaritmică (log. nr. de germeni pe ordonată în funcție de timp pe abscisă) sub forma graficului din fig. 1.34. Pe această curbă se disting cele patru faze de dezvoltare principale și două faze intermediare.

Formula matematică ce stă la baza acestui grafic și care constituie *legea de creștere a unei populații* este $\frac{dM}{dt} = KM$, adică viteza de creștere $\frac{dM}{dt}$ este proporțională cu masa substanței vii *(M)* printr-un factor *K*, numit constanta ratei de creștere. În realitate, *K* are o valoare constantă numai în perioada logaritmică (logaritmul masei bacteriene variază liniar cu timpul).

Analiza evenimentelor care apar în cursul dezvoltării unei culturi microbiene ne arată următoarele:

Faza de latență (lag.): celulele însămînțate într-un mediu lichid nu se înmulțesc, eventual are loc o creștere în volum. Este perioada în care celulele își programează activitatea metabolică pentru a putea folosi eficient substanțele nutritive din mediu. Aceasta este demonstrată de *fenomenul de diauxie* a lui Monod: cultivarea *E. coli* pe mediu sintetic sărac în glucoză (0,01%) și bogat în lactoză determină o curbă modificată (fig. 1.35). După perioada de lag în care celulele se programează pentru utili-

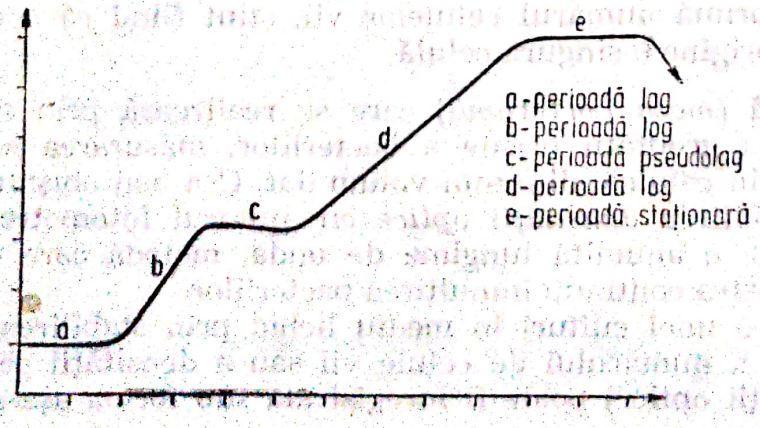


Fig. 1.35. Fenomenul de diauxie a lui Monod.

zarea glucozei, urmează o scurtă perioadă logaritmică (log.) pînă la epuizarea glucozei din mediu, apoi apare o perioadă de pseudolag. Aceasta se datorește represiei prin glucoză (represie catabolică) a biosintezei enzimelor din utilizarea lactozei (B-galactozidaza și permeaza). După epuizarea glucozei din mediu, lactoza induce sinteza acestor enzime (perioada de pseudolag) și prin metabolizarea lactozei cultura intră în multiplicarea logaritmică. În același sens pledează și faptul că dacă o bacterie în faza exponențială se inoculează pe același mediu de cultură, faza de latență dispare și cultura intră de la început în multiplicare logaritmică. Durata fazei de latență variază mult în primul rînd de la specie la specie (de exemplu b. tuberculozei are această fază foarte prelungită) și apoi, în raport cu condițiile de cultivare. Astfel dacă inoculul provine dintr-o cultură ce a ajuns în faza de declin, timpul necesar programării metabolice (faza de lag) se prelungește la 2—4 ore. Cu un inocul provenit dintr-un mediu complex (bulion nutritiv) și însămînțat pe un mediu sintetic cu glucoză, faza de latență durează aproximativ șase ore, timp necesar sintetizării enzimelor care să asigure celulei toți compușii chimici pornind numai de la glucoză.

Faza exponențială (logaritmică). Materialul celular începe să fie sintetizat cu o rată constantă, el avînd în același timp și o funcție catalitică, ceea ce duce la o creștere rapidă a masei celulare. Factorul K fiind constant, curba reprezintă o exponențială (dreaptă în coordonate semilogaritmice). Acest factor este caracteristic pentru o cultură microbiană efectuată în condiții bine definite (mediu de cultură, temperatură, *p*H etc.). El poate fi ușor determinat dacă se ține seama că dintr-o bacterie, după o diviziune, rezultă două, după două diviziuni rezultă patru, după n diviziuni rezultă 2^n germeni. Numind intervalul dintre două diviziuni, *timp mediu de generație* sau *timp de dublare a culturii* (t_D) și înlocuind în ecuația de creștere: $M = Mo$, $dM = 2Mo - Mo$, $dt = t_D$ rezultă $K = 1/t_D$, adică are semnificația de număr de generații pe oră. În practică se utilizează mai ales t_D, citind pe abcisă intervalul de timp necesar dublării masei bacteriene. Timpul de generație variază de la specie la specie. Astfel la b. coli el poate fi de 20′ în timp ce la b. tuberculos este în jur de 1000′. Apoi el este influențat de compoziția mediului de cultură: la b. coli, într-o cultură pe mediu complex (bulion), are o durată numai de 20′, în timp ce pe un mediu sintetic cu glucoză se prelungește la 60′.

Bacteriile în faza exponențială au unele particularități. Sînt reprezentate de celule tinere cu o cantitate mare de ARN, în special un număr mare de ribozomi și în consecință cu o sinteză activă de proteine. Aceste celule constituie formele tipice — morfologic, biochimic și antigenic pentru fiecare specie. Culturile în această fază sînt sensibile la acțiunea nocivă a factorilor fizici și chimici, iar antibioticele au efectul cel mai puternic (oportunitatea unei terapii cît mai precoce).

După un număr de generații, diviziunile se produc cu un ritm din ce în ce mai lent, intrînd în faza intermediară de încetinire a dezvoltării și apoi în faza staționară. Aceasta se datorește mai multor factori, dintre care cei mai importanți sînt epuizarea din mediu a unuia sau mai multor metaboliți esențiali dezvoltării, acumularea de substanțe toxice rezultate din metabolismul bacterian, modificări de *p*H și scăderea în mediu a tensiunii de O_2.

Faza staționară, cu o reducere mare a diviziunilor datorită modificărilor ce se produc în mediu, se caracterizează prin menținerea unui nu-

Scanned with OKEN Scanner

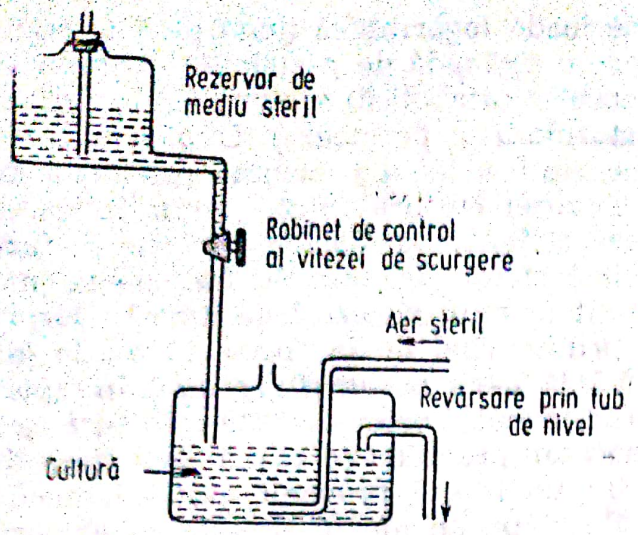


Fig. 1.36. Schema unui chemostat.

măr constant de celule vii (numărul celulelor vii rezultate din diviziune este egal cu al celulelor care mor).

Faza de declin. După ce cultura rămîne o perioadă de timp în faza staționară, perioadă ce variază în special în raport cu specia, rata celulelor care mor crește logaritmic, evenimente ce caracterizează faza de declin. Doar un număr mic de celule pot supraviețui săptămîni sau chiar cîteva luni. Aceasta poate să se explice prin faptul că puține celule se pot divide pe seama substanțelor nutritive rezultate din celulele moarte și lizate.

Spre sfîrșitul fazei staționare și a fazei de declin, celulele pot fi caracterizate ca celule îmbătrînite, cu peretele celular mai gros, o cantitate mai mică de ARN și număr redus de ribozomi cu o sinteză proteică lentă. Aceste celule sînt mai rezistente la factorii fizici și chimici și față de antibiotice.

* *
*

Culturi continue. O cultură microbiană poate fi menținută într-o perioadă exponențială permanentă. Pentru aceasta se asigură în vasul de cultură o aprovizionare continuă dintr-un rezervor cu mediu proaspăt, concomitent cu eliminarea unei cantități egale de cultură microbiană. Adăugînd menținerea prin aparatură automatizată a unui *p*H constant și aerare, cultura se păstrează într-o permanentă fază exponențială. Se utilizează pentru studii de metabolism sau obținerea unei cantități mari de masă celulară în scopuri industriale. Aceasta se realizează în aparate speciale, numite *chemostate* sau *biogene* (fig. 1. 36).

1.4. GENETICA BACTERIANĂ

Impresionînd de la începuturile descoperirii ei prin varietatea de forme și proprietăți biologice, lumea microorganismelor a constituit permanent un domeniu de confruntare teoretică în biologie (generația spontanee, adaptarea la mediu prin plasticitatea metabolică ș.a.). Intrînd în genetică prin descoperirile făcute la mijlocul secolului XX (tabel 1.14), bacteriile și bacteriofagii au inaugurat o nouă epocă în genetică, **genetica moleculară.**

Genetica studiază două fenomene biologice fundamentale: **ereditatea** sau stabilitatea unei specii prin transmiterea la descendenți a acelorași caractere (stabilitatea transmiterii caracterelor este asigurată de replicarea ADN, replicarea semiconservativă ducînd la molecule progen identice moleculei parentale) și **variabilitatea.** Variațiile caracterelor bacteriene pot

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.14

Principalele momente în evoluţia geneticii bacteriene

1928 — Griffith — Transformarea la pneumococ; genetică?
1944 — Avery, Mac Leod, Mc Carty — ADN purtătorul ereditătii la bacterii; transformarea fenomen genetic.
1953 — Watson, Crick — Structura ADN.

1939 — Ellis, Delbrück — Cinetica multiplicării bacteriofagilor (virusurile bacteriilor).
1943 — Luria, Delbrück — La bacterii există mutaţii (de la sensibilitate la rezistenţă faţă de bacteriofagi).
1946 — Delbrück — Există mutaţii induse la bacteriofagi.
Hershey — există mutaţii spontane la bacteriofagi.
1950 — Lwoff — Lizogenie înseamnă persistenţa bacteriofagului în celula bacteriană.
1952 — Hershey, Chase — ADN, purtătorul ereditătii la bacteriofagi.
1952 — Zinder, Lederberg — Bacteriofagii lizogeni pot transfera gene cromozomiale — transducţie.

1941 — Beadle, Tatum — Genetica reacţiilor biochimice la *Neurospora*.
— Tatum — Variante auxotrofe la *E.coli K 12*.
1946 — Lederberg, Tatum — La bacterii există recombinare (între mutantele auxotrofe ale *E.coli* K 12); fenomenul de conjugare.
1952 — Hayes, Cavalli-Sforza, Lederberg — Factorii F determină conjugarea; primele culturi Hfr.
1958 — Jacob, Wollman — Harta genetică a *E. coli* prin conjugare întreruptă.
1960 — Watanabe — Factor R de rezistenţă multiplă la chimioterapice.

fi grupate în două categorii (tabel 1.15): a. *fenotipice:* de exemplu, b. difteric are formă cocoidă pe mediile cu telurit şi formă bacilară în absenţa acestuia; b. difteric toxigen eliberează exotoxina difterică în mediu în funcţie de concentraţia ionilor de fier; *E. coli* îşi sintetizează β-galactozidaza dacă în mediu există lactoză sau un alt galactozid inductor; b. *genotipice:* de exemplu, cîştigarea rezistenţei faţă de antibiotice; pierderea sau cîştigarea unei proprietăţi de metabolism; pierderea sau cîştigarea

Tabel 1.15

Deosebirile dintre variaţiile fenotipice şi genotipice

Caracteristică	Variaţie	
	Fenotipică	Genotipică
Rolul factorului de mediu în prezenţa căruia identificăm variantele	Inductor al variaţiei	Selectiv al variantelor preexistente
Număr de celule din populaţie în care se produce variaţia	Toate sau majoritatea	$1/10^4 - 1/10^{10}$
Persistenţa variaţiei la descendenţi, în absenţa factorului de mediu	Nu	Da; descendenţii formează o clonă variantă
Determinismul variaţiei	Actualizare impusă de mediu a unei posibilităţi genetice (control metabolic)	Modificare a structurii materialului genetic

Scanned with OKEN Scanner

capacității de a produce factori de patogenitate. Ele sînt urmarea unei modificări în genomul celulei bacteriene. Variațiile fenotipice spre deosebire de cele genotipice nu se transmit ereditar.

Studierea materialului genetic și a eredității și la alte discipline ne permite ca în cele ce urmează să tratăm mai ales determinismul genetic și variațiile genotipice la bacterii.

1.4.1. ORGANIZAREA ȘI FUNCȚIONAREA MATERIALULUI GENETIC LA BACTERII

Fenomene moleculare

Genomul celulei bacteriene este alcătuit din secvențializarea riguroasă a aproximativ 10^7 perechi de dezoxiribonucleotide *(bp)*, organizate în cîteva macromolecule de ADN: cromozomul bacterian ($5 \times 10^6 bp$) și elementele eredității extracromozomiale. Funcționarea acestor secvențe este asigurată din interacțiunea cu proteine (tabel 1.16) și alți factori celulari, cărora catenele ADN le servesc drept matrice (tipar) sau substrat.

Tabel 1.16

Principalele proteine care interacționează cu ADN

	Activitate	Exemple E. coli
Proteine de reglare	Semnale în funcționarea unor părți din moleculă	— Represor lac; proteina CAP — Factorii sigma și rho ai ARN-polimerazei — Inițiatorul de replicare
Enzime de: — Polimerizare	ADN—polimerază	— ADN—polimeraza III — replicare ADN — ADN — polimeraza I — reparare leziuni u.v.
	ARN—polimerază	— ARN—polimeraza — în transcriere (ARNt, ARNr, ARNm) și sinteza primerului ARN în replicarea ADN.
— Modificare	ADN—ligază	— Leagă capete 5′-fosfat cu 3′-hidroxil; în replicare, sinteză reparatorie, recombinare
	ADN—metilază	— Eco RI — metilarea nucleotidelor subliniate în secvența 5′-GA*A*TTC-3′ 3′-CTT*A*AG-5′
— Nucleaze	Endonucleză de restricție	— Eco RI — endonucleză la locurile indicate cu ↑ în secvența 5′-G↓AATTC-3′ 3′-CTTAA↑G-5′
	Endonucleză care crestează și închide	— ADN-girază — despiralarea ADN-ului în replicare, recombinare
	Endonucleză de reparare u.v.	— Endonucleză u.v.r. A, B — excizia dimerilor de timină
	Ribonucleză H	— Îndepărtarea ARN primer apărut în timpul replicării ADN-ului.

Scanned with OKEN Scanner

Reamintim principalele fenomene moleculare la care ne referim în text:

Modificare — schimbarea unei baze încorporată în molecula ADN prin adaos sau înlocuirea unei grupări (mai ales, metilare).

Restricţie — întreruperea structurii covalente a ADN, prin endonucleaze, la nivelul unei secvenţe specifice sau în apropierea ei. Enzimele de restricţie recunosc secvenţe palindromice. Pentru multe enzime (de exemplu, EcoRI), fragmentele rezultate au capete coezive: o catenă este mai lungă decît cealaltă, secvenţele libere fiind complementare. Astfel de enzime se utilizează azi în clonarea moleculară. Fenomenul de restricţie şi modificare: moleculele proprii sînt metilate la nivelul palindromului imediat după polimerizare, ceea ce le face rezistente la acţiunea endonucleazei; molecula de ADN străin, nemodificată în celula de origine, este fragmentată de către endonucleaza de restricţie cu degradarea ulterioară a fragmentelor prin alte nucleaze.

Sinteză reparatorie — excizia localizată a unei structuri anormale dintr-o catenă (de exemplu, dimer de timină indus prin radiaţii u.v.), cu refacerea unei catene noi, complementară celei nelezate (fig. 1.37, *A, B, C*).

Transpoziţie — secvenţe de nucleotide sînt transpuse dintr-un loc în altul pe aceeaşi macromoleculă sau pe o alta. Fenomenul mediat de „transpozaze" (încă puţin cunoscute) ar implica uneori o „replicare localizată" în molecula ADN, deoarece apariţia secvenţei într-un loc nou nu este însoţită totdeauna de dispariţia ei de la localizarea iniţială. Apare atunci o duplicare a secvenţei. (v. transpozoni).

Replicarea (fig. 1.38) şi **transcrierea în ARN** sînt fenomene bine cunoscute.

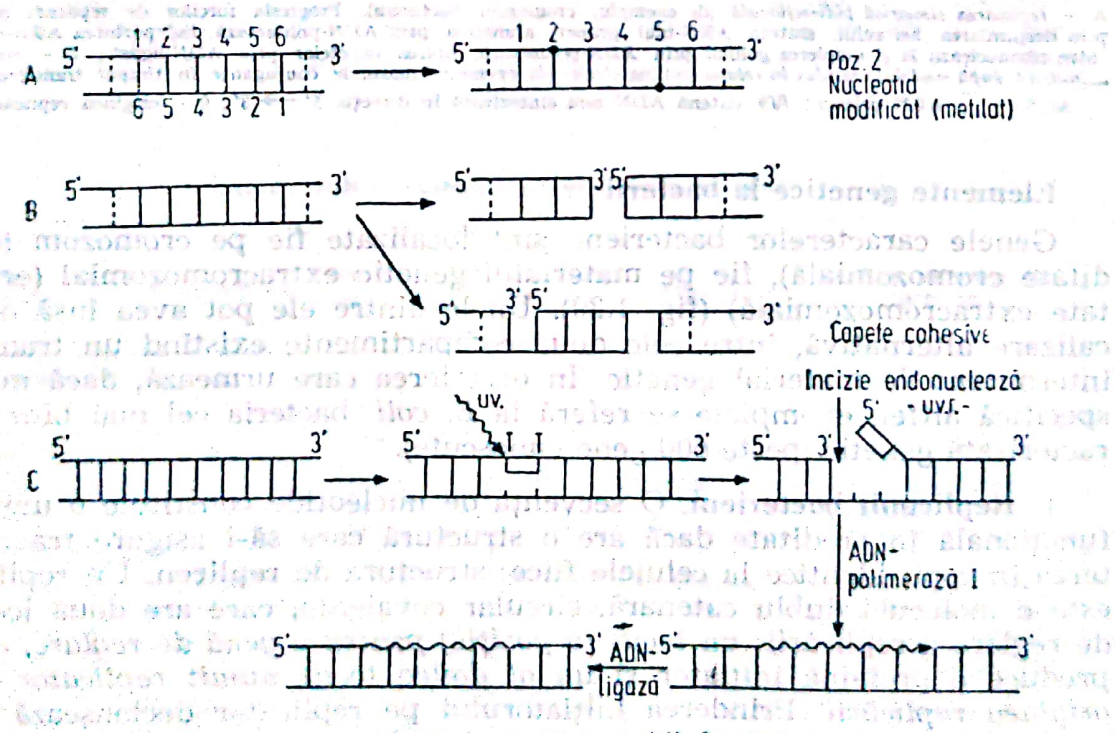


Fig. 1.37. Metilarea unei baze azotate într-un palindrom (*A*), împiedică acţiunea endonucleazei de restricţie (*B*); *C* — unul dintre mecanismele sintezei reparatorii. T T | | — dimer de timină.

Scanned with OKEN Scanner

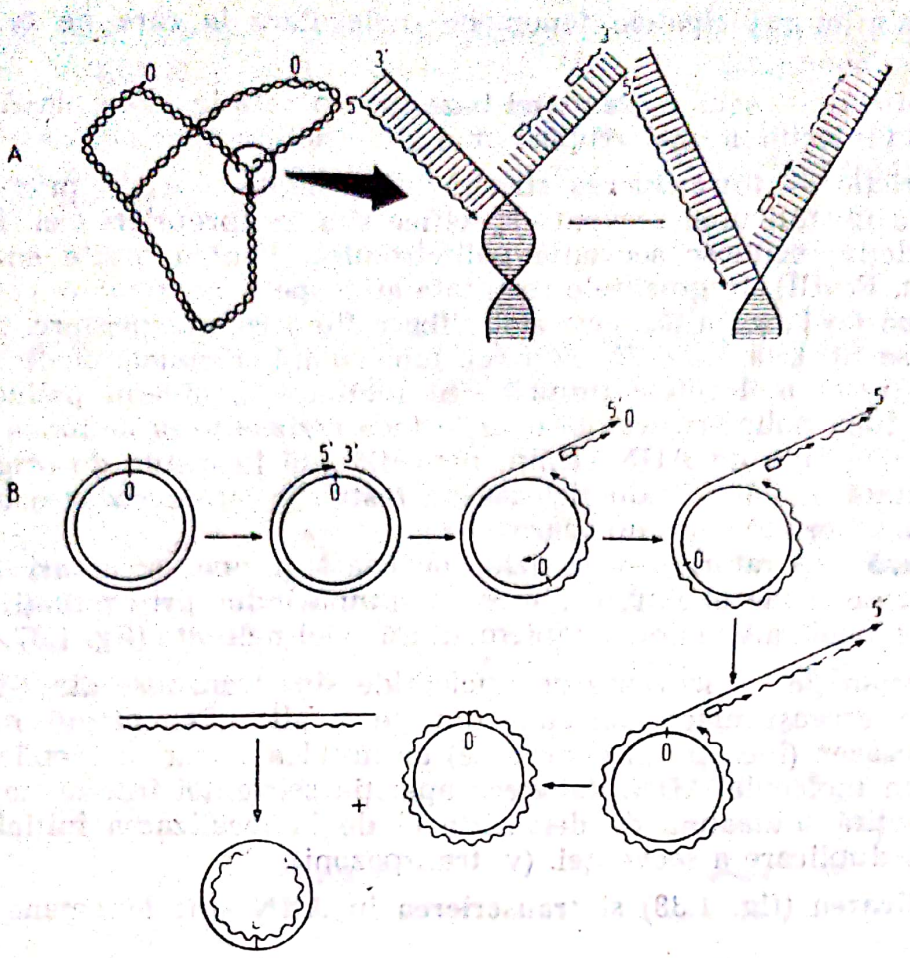


Fig. 1.38. **Replicarea ADN-ului:**

A — *replicarea simetrică bidirecțională* (de exemplu, cromozom bacterian). Progresia furcilor de replicare se face prin despiralarea helixului, sinteza ARN-ului primer, alungirea prin ADN-polimerază, îndepărtarea ARN-ului de către ribonucleaza H și umplerea golului prin ADN-polimerază, lipirea capetelor prin ADN-ligază; *B — replicarea simetrică după modelul inelului în rotație* (rolling circle) (de exemplu, plasmide conjugante în timpul transferului de ADN) ▭ ARN primer; ∿ catenă ADN nou sintezizată în direcția 5′ ⟶ 3′; 0 — originea replicării.

Elemente genetice la bacterii

Genele caracterelor bacteriene sînt localizate fie pe cromozom (ereditate cromozomială), fie pe materialul genetic extracromozomial (ereditate extracromozomială) (fig. 1.39). Unele dintre ele pot avea însă o localizare alternativă, între cele două compartimente existînd un transfer intermitent de material genetic. În descrierea care urmează, dacă nu se specifică altfel, exemplele se referă la *E. coli*, bacteria cel mai bine caracterizată genetic (peste 600 gene cunoscute).

1. **Repliconii bacterieni.** O secvență de nucleotide constituie o unitate funcțională în ereditate dacă are o structură care să-i asigure transmiterea în copii identice la celulele fiice: structura de **replicon.** Un replicon este o moleculă dublu catenară, circular covalentă, care are două locuri de reglare a replicării: *un locus (o poziție) pentru o genă de reglare,* care produce o proteină inițiator și un *al doilea locus numit replicator* sau *originea replicării.* Prinderea inițiatorului pe replicator declanșează replicarea din acest punct. Inițiatorul este instabil și se consumă în procesul de inițiere a replicării, intervenind în acest fel în controlul ciclului celular. Cele două molecule de ADN nou sintetizate trebuie să fie separate

Scanned with OKEN Scanner

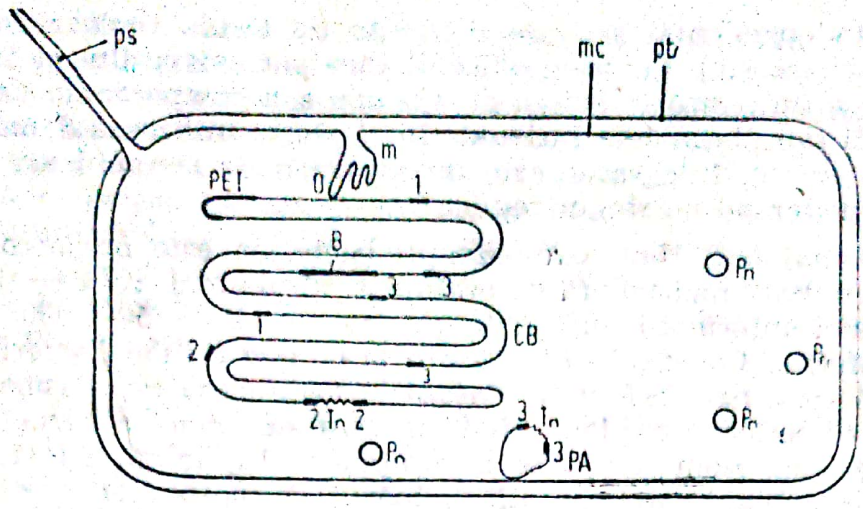


Fig. 1.39. Organizarea materialului genetic bacterian:

CB — cromozom bacterian; O — origine de replicare; PEI — plasmidă epizomală integrată; B — profag; PA — plasmidă autonomă conjugantă; Pn — plasmide neconjugante; 1, 2, 3 — secvenţe de inserţie; Tn — transpozon; m — mezozom; mc — membrană citoplasmatică; pb — perete bacterian; ps — pil de sex.

după replicare şi distribuite celulelor fiice rezultate din diviziunea celulară (segregarea). Pentru cromozom şi plasmide mari aceasta se realizează prin ataşarea moleculei de ADN la membrana citoplasmatică, formarea a două locuri de ataşare pentru moleculele progen şi separarea lor prin apariţia septului de diviziune celulară. Repliconii diferiţi au puncte specifice, diferite de ataşare. Unii repliconi pot avea două sau mai multe origini de replicare (v. plasmida F), dar acestea nu funcţionează simultan. Un replicon mai conţine, de obicei, gene structurale sau de reglare, specificînd diverse caractere.

Repliconii bacterieni sînt: *cromozomul bacterian, genomul bacteriofagilor temperaţi* şi *plasmidele* (tabel 1.17). În raport cu cromozomul bacterian, genomul fagic şi plasmidele se pot afla în două stări: *stare autonomă*

Tabel 1.17

Caracteristicile materialului genetic la bacterii

Tip de ereditate	Elemente genetice	Repliconi	Elemente genetice mobile	Ordin de mărime (perechi de baze)	Autotransferabil la alte bacterii	Gene pentru proprietăţi bacteriene
Cromozomială	Cromozom	+	−*	5×10^6	După liza celulei	+
Extracromozomială	Genom fag temperat	+	+	10^5	Infecţie fagică	+ : conversie lizogenă rar fagi transductanţi
	Plasmide — conjugante — neconjugante	 + +	 + +	 10^4-10^5 10^3-10^6	 Conjugare —	+ : plasmide de rezistenţă, metabolice, pentru factori de patogenitate etc.
—	Secvenţe de inserţie (IS) şi transpozoni(Tn)	—	+	10^3-10^3	—	+ : în transpozoni

* Genele cromozomiale pot fi mobilizate de elementele genetice mobile

Scanned with OKEN Scanner

(replicare independentă) și *stare integrată* (molecula repliconului fuzionată cu cromozomul). Pentru repliconii care pot exista alternativ în cele două stări se utilizează termenul de *epizomi* sau *comportament epizomal*. Pentru fagii sau plasmidele fuzionate între ele se utilizează denumirea de *stare co-integrată*. Integrarea este un fenomen de recombinare, în noul replicon funcționînd un singur replicator.

Cromozomul bacterian. Cromozomul bacterian este o macromoleculă unică, cu greutate moleculară de ordinul a 10^9 daltoni, ceea ce îi permite stocarea unei informații suficiente pentru sinteza a 5—6 000 molecule proteice diferite. Constituie 1—2% din greutatea celulei bacteriene, este localizat în zona nucleară și se atașază la membrana citoplasmatică prin mezozomi. O celulă bacteriană aflată în faza staționară a curbei de creștere conține un cromozom, dar în timpul multiplicării, cu cît rata de diviziune este mai mare, cu atît numărul cromozomilor crește (2—4). Celula bacteriană este haploidă, fără gene alele. Poziția relativă a genelor pe cromozom indicată de harta genetică a putut fi stabilită parțial la diferite specii bacteriene, dintre care *E. coli* este bacteria cu cele mai multe gene cartografiate (fig. 1.40).

Genomul fagic. Bacteriofagii (fagii bacterieni) sînt virusuri care parazitează bacteriile. Nu au structură celulară, unitatea morfologică — **virionul** — fiind formată din **capsidă** (cutie proteică), în interiorul căreia este protejat **genomul fagic** (fie ADN, fie ARN). Foarte mulți bacteriofagi mai au o coadă, mecanism de injectare a acidului nucleic în celula bacteriană. Infecția celulei bacteriene poate evolua ca:

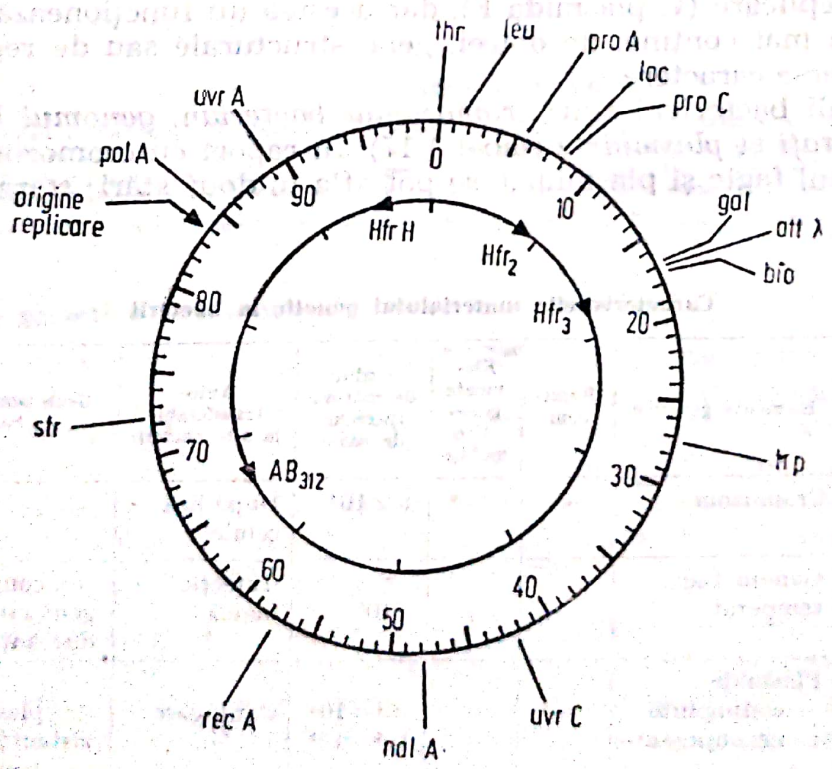


Fig. 1.40. **Harta cromozomului de la** *E. coli*.

Distanțele sînt măsurate în minute necesare transferului prin conjugare. Sînt menționate cîteva locusuri din cele cîteva sute cunoscute: locusuri ale genelor de sinteză a treoninei (thr), leucinei (leu) etc., de utilizare a unor zaharuri ca lactoză (lac), galactoză (gal), de rezistență cromozomială la Streptomicină (str), acid nalidixic (nal). Este marcată originea replicării. În interior sînt marcate (→) cîteva din punctele de integrare a factorului F, dînd naștere la diverse tulpini Hfr; orientarea săgeții arată ordinea în care sînt transferate genele cromozomiale în conjugare.

Scanned with OKEN Scanner

— *ciclu litic* — introdus în celulă genomul fagic rămîne în stare autonomă, se multiplică „vegetativ". Moleculele de acid nucleic progen și proteinele de informație virală sintetizate în celula infectată se asamblează în virioni, eliberați prin liza celulei; bacteriofagii care se multiplică numai litic sînt numiți *virulenți* (exemplu T_1—T_7);

— *ciclu lizogen* — genomul fagic se inseră în cromozom, repliconul fagic multiplicîndu-se ca o regiune genetică obișnuită a repliconului cromozomial, genele sale vegetative fiind represate (stare integrată). Fenomenul se produce în $1/10^4$—$1/10^8$ din celulele infectate. Genomul fagic se numește *profag*, iar celula cu profag, *celulă lizogenizată* de bacteriofagul respectiv. Descendenții acestei celule sînt la rîndul lor purtători de profag. Cînd genele vegetative nu mai sînt represate, genomul fagic este excizat din cromozom și repliconul fagic se multiplică autonom după modelul ciclului litic. Bacteriofagii care pot lizogeniza sînt numiți temperați (de exemplu, λ, Pl sau Mu-l). Genomul unor fagi temperați conține în mod constant gene care determină proprietăți bacteriene (vezi conversia lizogenă).

Plasmidele sînt elemente genetice extracromozomiale definite ca purtătoare ale unor informații ereditare neesențiale pentru viața bacteriilor care pot fi pierdute fără a afecta viabilitatea bacteriilor. Plasmidele constituie o populație heterogenă de repliconi (tabel 1.18) cu grad diferit

Tabel 1.18

Tipuri de plasmide

Tip	Exemple
Plasmide conjugante (operonul tra)	F, R_1, Col I — *E. coli* pfmd — *Pseudomonas* P — *Vibrio cholerae* pAD1 — *Streptococcus faecalis*
Plasmide de rezistență Rezistență la chimio-terapice	R_1, R_6, R_{100} — enterobacterii pJH5 — *Streptococcus faecalis*
Rezistență la metale grele (Hg, Cd, As etc.)	R_6 — *E. coli* 01258 — *Staphylococcus aureus* pLM3001 — *Streptococcus lactis*
Rezistență la ultraviolete	Col Ib, R_{46} — *E. coli* pAD_1 — *Streptococcus faecalis*
Plasmide pentru producere de bacteriocine și antibiotice	Col E_1 — *E. coli* pAD_1 — *S. faecalis*
Plasmide metabolice Utilizare: lactoză, uree, fixare azot Degradare camfor, salicilați	enterobacterii pLM_{3001} — (lactoză) *Streptococcus lactis* Cam, Sal — *Pseudomonas*
Plasmide pentru factori de patogenitate Enterotoxină, factor de colonizare Aderență pe smaltul dentar Hemolizină etc.	Ent — *E. coli* *Streptococcus mutans* Stafilococi, hemoliză α-streptococi

Scanned with OKEN Scanner

de complexitate structurală și genetică, de la molecule mici, avînd probabil numai capacitate de replicare (posibil sub 10 gene), pînă la molecule conținînd 100 gene. Într-o celulă bacteriană pot exista 20—30 tipuri de plasmide diferite, cîte 10—20 copii moleculare pentru plasmidele mici, dar numai cîte o singură moleculă pentru plasmidele mari, conjugante. Proprietățile lor sînt determinate de: 1. prezența genelor de integrare în cromozom (plasmide epizomale); 2. prezența genelor responsabile de transferul plasmidei la alte celule bacteriene prin fenomenul de conjugare (genele operonului tra la plasmidele conjugante, de sex); 3. prezența genelor care specifică diverse caractere bacteriene ca rezistența la antibiotice în plasmidele R, producere de bacteriocine în plasmidele col, proprietăți metabolice ș.a.; 4. prezența în plasmidele mari a unor gene de excludere a pătrunderii în celulă a altui replicon și gene de incompatibilitate, prin care o plasmidă împiedică stabilirea în celulă a unei plasmide înrudite (aflată în aceeași grupă de incompatibilitate). Există peste 15 grupe de incompatibilitate la *E. coli,* 6 grupe la *Pseudomonas* etc.

Cel mai bine sînt cunoscute plasmidele conjugante de fertilitate F (fig. 1.41), de rezistență la antibiotice — R (fig. 1.42) și de colicinogeneză—Col, cu o importanță deosebită în fenomenele de transfer genetic și recombinare.

2. **Elemente genetice transpozabile.** În structura repliconilor s-au descoperit segmente mobile care pot fi transpuse în oricare alt loc pe aceeași moleculă sau pe o altă moleculă de ADN, *secvențe de inserție*—IS (fig. 1.43). Cu o lungime de ordinul 10^2—10^3 bp, ele se pot găsi în mai multe exemplare în aceeași moleculă, de exemplu, la *E. coli,* IS 1 în 6—9 locuri, IS 2 în 4—6 locuri, avînd secvența orientată în aceeași direcție sau în direcție opusă. Inserția unui IS în mijlocul unei gene îi întrerupe continuitatea, inhibînd în același timp exprimarea celorlalte gene din operon. Aceleași IS pot fi prezente în mai mulți repliconi, de exemplu, IS2 și IS3 sînt găsite și în plasmidele F și R. La locul acestor IS se produc evenimente de recombinare nelegitimă—integrare sau excizie din cromozom și co-integrare. Al doilea element transpozabil îl constituie *transpozonul*—Tn. Transpozonii sînt segmente mai mari din ADN, conținînd una sau mai multe gene, flancate de două copii ale aceluiași IS, de obicei orientate

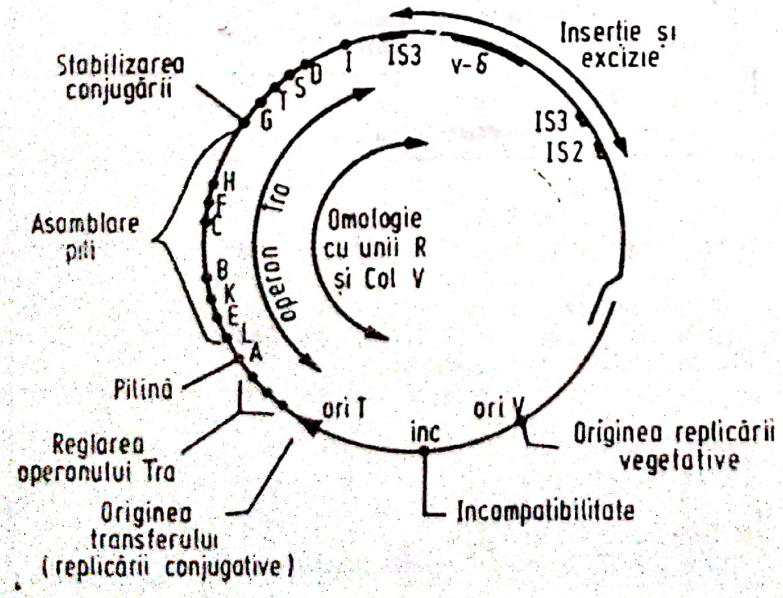


Fig. 1.41. **Plasmida F.**
Majusculele indică gene ale operonului de transfer (Tra). Elementele de inserție (IS 2 etc.) constituie locuri de integrare pentru diversele tulpini Hfr. În conjugare ordinea de trausfer este ori T-inc- ori V- etc., operonul (Tra) rămînînd la urmă.

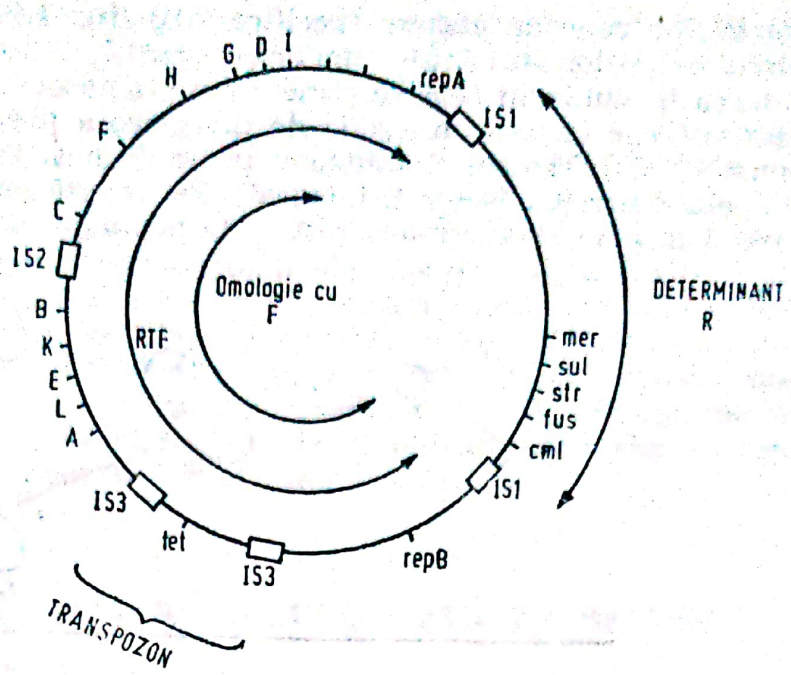


Fig. 1.42. Plasmida R 100—1.

Plasmidă co-integrată prin elemente IS 1, formată din factorul de transfer — RTF şi determinantul R. Omologia RTF cu factorul F este întreruptă de inserţia unui transpozon — Tetraciclină. Majusculele indică gene ale operonului Tra; rep A, rep B — replicare; gene de rezistenţă: tet — Tetraciclină; cml — Cloramfenicol; str — Streptomicină etc.

în sens opus. Aşa de exemplu sînt determinanţii r (rezistenţă la antibiotice) din plasmidele R, sau întregul genom al fagului temperat Mu. Transpoziţia unui Tn fără dispariţia de la locul iniţial duce la duplicarea sau multiplicarea segmentului genetic cuprins între IS (amplificare genică). *Segmentele invertibile* sînt secvenţe care pot fi inserate în acelaşi loc în ordine inversă, modificînd proprietăţile genetice ale întregii zone de nucleotide — de exemplu, fagul Mu infectează *E. coli* sau *Serratia marcescens* în funcţie de orientarea segmentului invertibil G.

3. Integrarea repliconilor este un fenomen de recombinare şi se petrece la nivelul unor zone restrînse de omologie între cei doi repliconi,

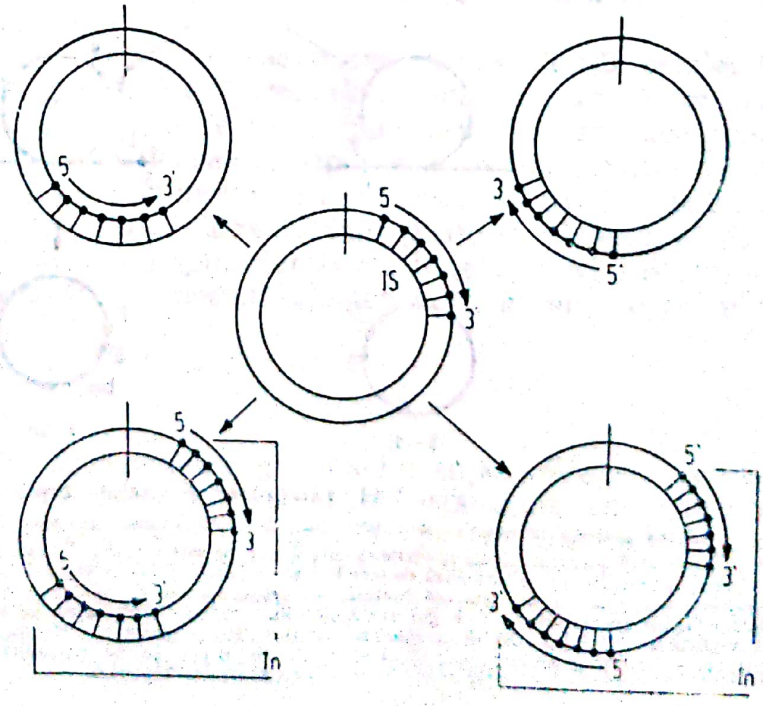


Fig. 1.43. Elemente transpozabile în structura ADN-ului.

O secvenţă de inserţie — IS poate fi transpusă în alt loc pe aceeaşi moleculă de ADN sau o altă moleculă (nu este prezentată în figură), ordinea nucleotidelor fiind aceeaşi sau inversată. Duplicarea IS creează un segment transpozon Tn, care la rîndul lui poate fi transpus ca un IS.

Scanned with OKEN Scanner

fie IS, fie zone de atașare specifice (att) (fig. 1.44). Cele două molecule circulare fuzionează într-o singură moleculă. Astfel plasmida F se poate integra în unul din cele 15 puncte din cromozom în care există secvențe IS omoloage cu cele din zona de integrare a plasmidei. O celulă bacteriană F^+ (cu factorul F autonom) poate da naștere la cel puțin 15 tipuri de celule Hfr (cu factor F integrat). Pe de altă parte profagul λ se integrează într-un singur punct (att λ). O populație bacteriană în care există

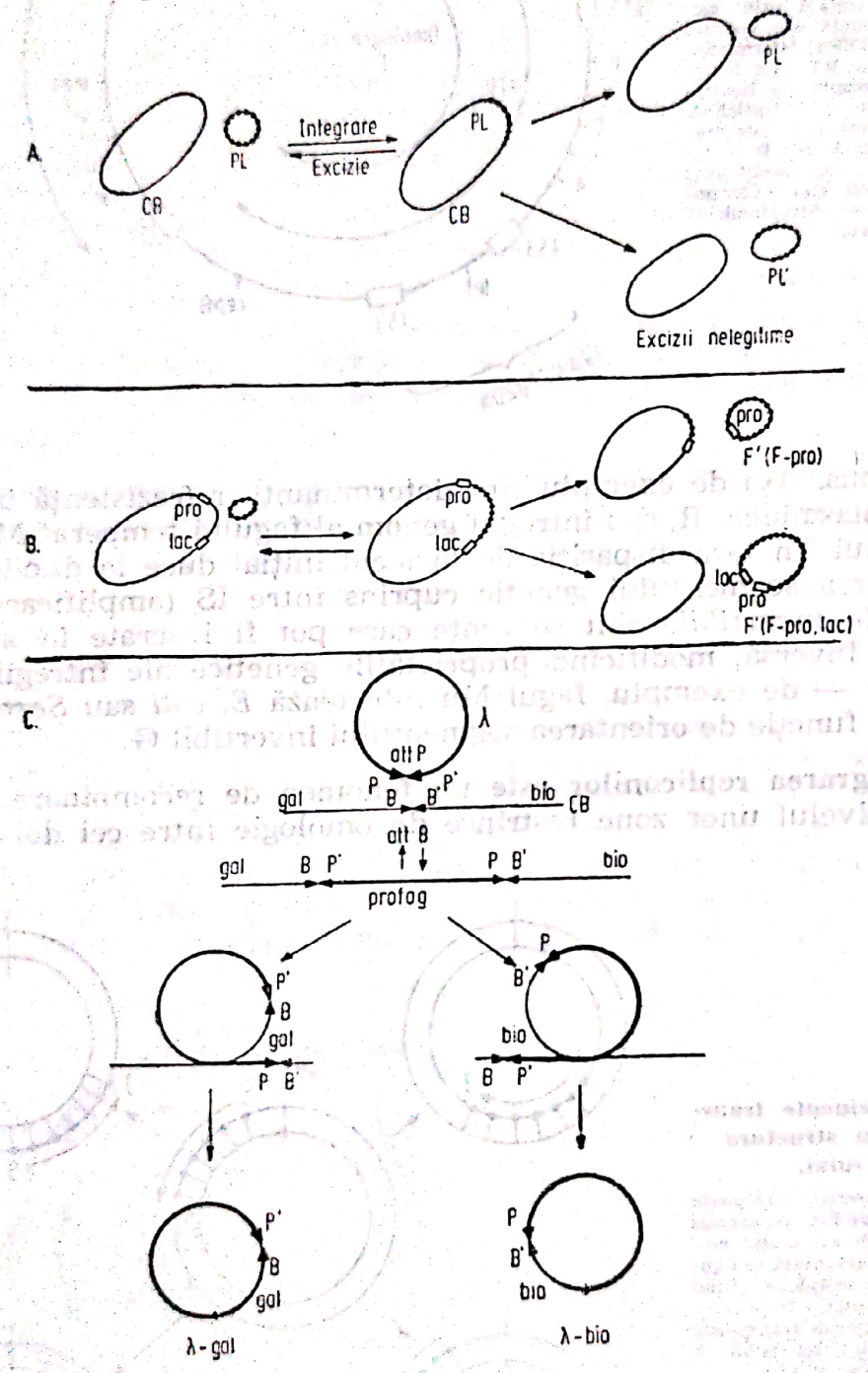


Fig. 1.44. Integrarea și excizia repliconilor:

A — schema generală: o excizie nelegitimă duce la incorporarea de gene cromozomiale în repliconul autonom; *B — factorul F autonom* (celula bacteriană care îl conține este numită F^+) se poate integra (celulă bacteriană Hfr). Prin excizie nelegitimă se formează factori F'; *C — genomul bacteriofagului λ se integrează între locurile genetice gal* (utilizare galactoză) *și bio* (sinteză biotină) *ale cromozomului E. coli*. Excizia nelegitimă duce la formarea genomului fagilor transductanți λ — gal sau λ-bio, din care, de obicei, lipsesc gene ale multiplicării autonome, astfel că devin litic defectivi (λd). CB — cromozom bacterian; PL — plasmidă; PL' — plasmidă cu gene bacteriene; lac, pro, gal, bio — locusuri genetice; att P (P, P'), att B (B, B') — loc de recombinare situs, specifică în genomul fagic și cromozomul bacterian.

Scanned with OKEN Scanner

un replicon epizomal conține atît celule cu replicon autonom, cît și cu replicon integrat, raportul cantitativ fiind însă de $1/10^4$—$1/10^6$ în favoarea uneia dintre stări. Excizia exactă a moleculei integrate printr-un mecanism invers integrării readuce repliconii în stare autonomă. O excizie petrecută în alte puncte decît cele de integrare poate duce la încorporarea în molecula repliconului autonom a unor gene cromozomiale din apropiere. Astfel se formează plasmidele F′ (de exemplu, F-lac, F-pro) sau genomul bacteriofagilor transductanți (de exemplu, λ-gal, λ-bio). Unii repliconi sînt în mod constant cointegrați, de exemplu, plasmidele R sînt formate dintr-un replicon cu gene de transfer asemănătoare factorului F (RTF — factor de transfer a rezistenței), integrat cu un replicon conținînd gene de rezistență la antibiotice (determinant r). Integrarea și transpoziția sînt principalele modalități de mobilizare a genelor cromozomiale în transferul de material genetic intercelular.

1.4.2. MODIFICAREA MATERIALULUI GENETIC LA BACTERII

Modificarea secvenței de nucleotide se poate datora înlocuirii unor nucleotide cu altele, adăugirii sau pierderii de nucleotide (de la o pereche de baze la zeci de mii de perechi), inversării sau transpoziției unui segment din moleculă. Acestea se produc prin mutație și transfer intercelular de material genetic. În ambele modalități se pot deosebi nivele distincte în realizarea lor:

— *nivelul genomic* cuprinde mecanismele moleculare care duc la apariția modificării secvenței și la menținerea acestei modificări în genom (fixarea mutației, recombinarea materialului transferat sau stabilirea acestuia ca replicon autonom);

— *la nivelul celular,* mecanismele moleculare specifice exprimă fenotipic informația genetică din segmentul supus modificării, ceea ce duce la un comportament diferit al celulei cu genom modificat în raport cu celula parentală, sălbatică. Noul caracter prin care recunoaștem producerea modificării constituie un marker genetic;

— *la nivelul populației* de celule bacteriene. Descendenții celulei în care s-a produs variația genotipică formează o clonă variant care trăiește în același mediu cu populația de celule parentale. Un marker genetic utilizat efectiv pentru identificarea și separarea celulelor variant este un marker selectiv. În natură, în funcție de presiunea selectivă a mediului și interacțiunea cu celelalte celule, clona variant poate să dispară, să constituie o fracțiune constantă a populației bacteriene sau să înlocuiască populația parentală. Factorii de mediu selectează la nivelul populației.

Mutația

Mutația a fost definită în genetica organismelor superioare ca o schimbare a unui caracter, bruscă, cu frecvență scăzută, spontană, transmisibilă la descendenți. Astfel, un fenomen petrecut în genom era definit prin efectul fenotipic. Tehnici moderne permit identificarea secvențelor schimbate și putem spune astăzi că mutația este o schimbare a secvenței de nucleotide, în absența interacțiunii acesteia cu o altă secvență. O interacțiune între secvențe este o recombinare, nu o mutație. Cunoscînd rolul

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.19

Caracterizarea principalelor mutaţii

Segment interesat	Schimbarea secvenţei ADN	Modificarea codonilor	Efect în sinteza proteinelor	Exprimarea fenotipică a mutaţiei finale	Mutaţia înapoi		
					revers-mutaţie	supresoare intragenic	supresoare intergenic
Mutaţii punctiforme (1 bp)	— Substituţie	În funcţie de noul codon — mutaţii acelaş sens — Alt codon pentru acelaş aminoacid	Structură nemodificată	mutaţie tăcută	+	—	—
		— mutaţii sens greşit — Codon pentru alt aminoacid	Structură proteică modificată, proteina : activă sau inactivă	Pierdere, modificare sau cîştig de funcţie	+	+	+
		— mutaţii nonsens — Codoni stop	Polipeptid incomplet		—	+	—
	— Adiţie — Deleţie	În general, schimbarea tuturor codonilor următori — schimbarea cadrului de citire a codului genetic	Polipeptid modificat sau incomplet		—	+	—
Mutaţii extinse (fragment de genă sau de cromozom)	— Deleţii — Inserţii — Inversii	În foarte multe cazuri se petrece în realitate o inserţie (IS, Tn)	Fragmente polipeptidice terminate prematur		—	—	—
					+ prin transpoziţie + prin inversie		

Scanned with OKEN Scanner

ADN în celulă înțelegem de ce se transmite modificarea secvenței la descendenți și cum se modifică un caracter: schimbarea tripletelor de nucleotide poate fi urmată de schimbarea aminoacizilor dintr-o proteină, de schimbarea ribonucleotidelor dintr-un ARNt sau ARNr, în sfîrșit, factorii de reglare (proteine, ARNt) nu mai recunosc secvența schimbată.

Tipuri de mutație. După mărimea modificării mutațiile pot fi *punctiforme* sau *extinse* (tabel 1.19). Modificările extinse (deleții, inserții, inversii), considerate multă vreme ca erori de replicare, apar deseori în urma unei transpoziții; sînt în aceste cazuri *recombinări*. În sens strict numai mutația punctiformă corespunde totdeauna definiției și o vom analiza în cele ce urmează. Cel mai bine sînt cunoscute mutațiile din genele de structură, gene în care informația genetică este purtată de triplete de nucleotide transcrise în codon ARNm (fig. 1.45). În aceste gene, substituirea unei perechi de nucleotide cu alta duce la apariția unui nou codon, ceea ce face ca mutațiile să fie denumite: cu *același sens, sens greșit* sau *nonsens*. Expresia fenotipică a mutației depinde de traducerea acestui nou codon. Adiția și deleția punctiformă duc la o altă grupare a nucleotidelor (schimbarea cadrului de citire) în triplete. În funcție de modificarea proteinei în urma mutației și de rolul acesteia în celulă, mutația poate fi *letală, tăcută* sau *să se manifeste prin pierderea* sau *modificarea unei proprietăți, eventual cîștigarea unei proprietăți noi*. O categorie interesantă o constituie *mutațiile condiționat letale:* în anumite condiții, de exemplu, incubate la 40°C, bacteriile nu se dezvoltă sau mor, în timp ce în alte condiții, de exemplu, la 30°C ele se multiplică. Acești mutanți constituie un exemplu asupra rolului mediului în exprimarea fenotipică a unei potențialități genetice.

Tipuri de mutante la bacterii. Mutația poate interesa orice caracter bacterian (tabel 1.20): morfologic, de cultură, biochimic etc. De importanță deosebită în studierea mutației și recombinării s-au dovedit:

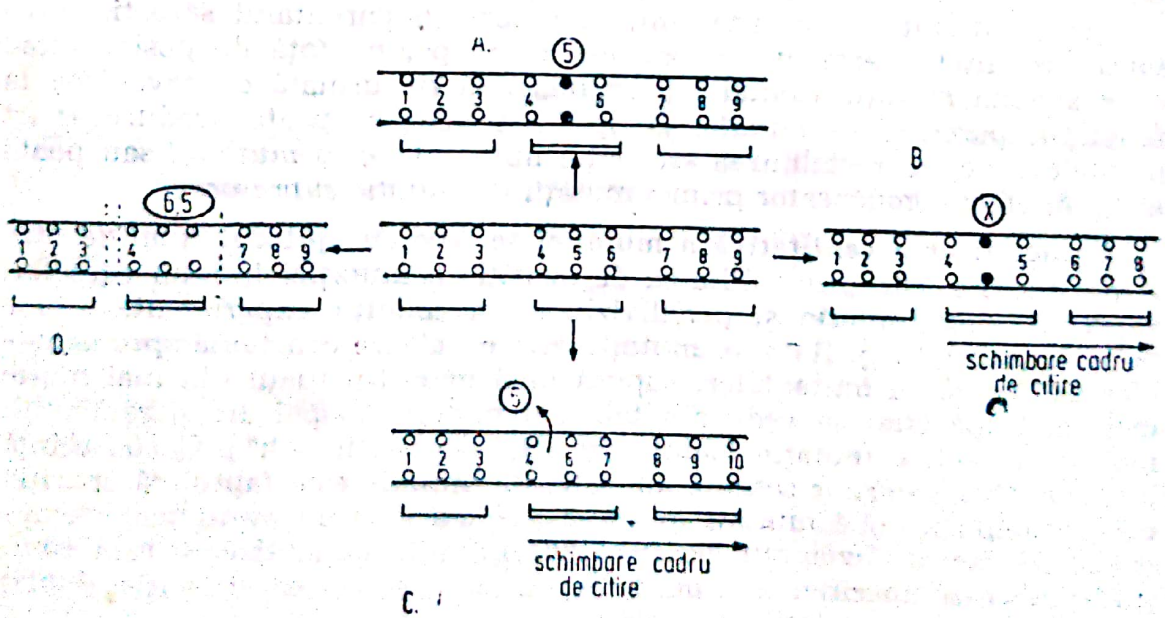


Fig. 1.45. Efectele mutațiilor punctiforme asupra citirii codului genetic:
A — substituția modifică un singur codon; B — adiția și C — deleția schimbă toți codonii care urmează locului de producere a mutației; D — inversia schimbă unul sau mai mulți codoni, în funcție de lungimea secvenței supuse mutației. Încercuit — bazele supuse mutației. 1, 2, 3 — ordinea perechilor de nucleotide. |——| — codoni ARN m la parental. |——| — codoni ARN m în mutant, modificați față de codonii corespunzători ai parentalului.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.20

Tipuri de mutante

Caractere	Exemple de mutante
— Morfo-tinctoriale	
Perete bacterian	Perete defect (lipsă sinteză acid diaminopimelic)
Cili	Rigizi, lipsă
Pili	Mutante nefimbriate
Capsulă	Necapsulate (pneumococ)
Spor	Asporogene
— Morfologia coloniilor	S –:- R, mucoide, pitice
— Biochimice	
Necesităţi de noi factori de creştere (auxotrofe)	Bio^+ –:- Bio^- nu sintetizează biotina His^+ –:- His^- nu sintetizează histidina
Fermentative	Lac^+ –:- Lac^- nu fermentează lactoza
Pigmentare	
— Rezistenţă la agenţi inhibanţi	Str^s –:- Str^r
— Rezistenţă la bacteriofagi	
— Antigenice	S –:- R la gramnegativi
— Virulenţă	Virulent –:- nevirulent (pneumococ)

— *mutantele de rezistenţă faţă de antibiotice* se pot uşor selecta pe mediile de cultură; au servit la cunoaşterea mecanismului de acţiune al chimioterapicelor; constituie un exemplu ilustrativ de cîştigare a unei proprietăţi noi. Mutantele la rezistenţă faţă de antibiotice sau bacteriofagi au permis stabilirea definitivă a caracterului spontan al mutaţiei;

— *mutantele biochimice auxotrofe* au permis descoperirea recombinării la bacterii;

— *mutantele biochimice fermentative,* în special cele referitoare la fermentarea lactozei, au permis lui J a c o b şi M o n o d descifrarea structurii operonului bacterian.

Toate mutantele amintite sînt, în raport cu parentalul sălbatic, mutante „înainte". Termenul a fost ales prin opoziţie faţă de posibilitatea ca o a doua mutaţie (mutaţie în mutant) să fie urmată de revenirea la fenotipul parental — *mutaţie „înapoi"*. Aceasta se poate produce exact în acelaşi loc, cu restabilirea secvenţei iniţiale *(revers-mutaţie)* sau poate avea un efect compensator primei mutaţii — *mutaţie supresoare.*

Caracterizarea cantitativă a mutaţiei se face cu ajutorul *ratei de mutaţie.* Aceasta este probabilitatea de apariţie a mutaţiei într-un caracter, exprimată per/bacterie şi per/diviziune, în condiţii experimentale bine definite (tabel 1.21). Rata de mutaţie este o valoare constantă spre deosebire de frecvenţa mutantelor, supusă unei mari fluctuaţii din mai multe motive. După cum se vede din tabel, o mutaţie înapoi are o rată mult mai mică decît o mutaţie înainte (vezi h^+—h^- şi h^-—h^+). O consecinţă importantă a valorilor scăzute ale ratei de mutaţie este faptul că apariţia concomitentă a două mutaţii în aceeaşi celulă este un eveniment excepţional de rar; de exemplu, pentru două mutaţii avînd fiecare rata 10^{-7}, probabilitatea apariţiei concomitente în aceeaşi celulă (mutaţie dublă) ar avea valoarea de 10^{-14}.

Mecanismele moleculare ale mutaţiei naturale sînt numai în parte cunoscute. Un rol important în cunoaşterea lor l-au avut mutaţiile induse: utilizarea unor agenţi fizici sau chimici mutageni care induc apariţia

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.21

Rate de mutaţie

Variaţia	Specia	Rata
Pigmentare*	Serratia marcescens	1×10^{-4}
Fază antigenică flagelară*		
Fază I — fază II	Salmonella typhimurium	3×10^{-4}
Fază II — fază I	,,	1×10^{-5}
Rezistenţă radiaţii	Escherichia coli	1×10^{-5}
Rezistenţă la fag T_1	,,	3×10^{-8}
Rezistenţă la penicilină	Staphylococcus aureus	1×10^{-7}
Rezistenţă la streptomicină (25μg)	Salmonella typhi	5×10^{-9}
Rezistenţă la streptomicină (1000 μg)	,,	1×10^{-10}
,,	Escherichia coli	1×10^{-10}
,,	Pseudomonas aeruginosa	4×10^{-10}
Dependenţă de histidină ($h^+ \rightarrow h^-$)	Escherichia coli	1×10^{-6}
Independenţă de histidină ($h^- \rightarrow h^+$)	,,	3×10^{-8}
Incapacitate de utilizare a galactozei ($gal^+ \rightarrow gal^-$)	,,	1×10^{-10}

* În afara acestora, ratele au fost calculate pe baza testului fluctuaţiei.

mutaţiilor cu o frecvenţă crescută (tabel 1.22). După cum se vede, în multe cazuri bazele azotate, modificate sau înlocuite, formează legături de hidrogen anormale, care în replicări ulterioare normale duc la schimbarea perechii de baze. Astfel că mecanismele naturale cele mai frecvente sînt:

— *formarea de legături de hidrogen anormale prin structură chimică temporar modificată a bazelor* (tautomerie). De exemplu, timina în forma ceto (întîlnită normal) formează legături cu adenina (T—A) în timp ce forma enol (foarte rară) formează legături de hidrogen cu guanina (T—G);

Tabel 1.22

Agenţi mutageni

Agent	Mecanism	Schimbarea perechii de baze
Analogi de baze		
5-brom-uracil	În loc de T, pereche greşită cu G	A—T → G—C G—C → A—T (rar)
2-aminopurină	În loc de A, pereche greşită cu C	A—T → G—C G—C → A—T (rar)
Substanţe care reacţionează cu ADN		
acid azotos	Dezaminare A, C	A—T → G—C G—C → A—T
hidroxilamină	Reacţionează cu C	G—C → A—T
agenţi alchilanţi	— Metilează G; pereche greşită cu T — Leagă între ele cele două catene; excizie greşită prin ADN-ază	G—C → A—T Mutaţii punctiforme şi deleţii
coloranţi (exemplu acridine)	Inserare între baze	Schimbarea cadrului de citire
Radiaţii ultraviolete	Dimeri pirimidină	Repararea poate duce la substituţii sau deleţii
Radiaţii ionizante (X)		,,

Scanned with OKEN Scanner

— *formarea de legături de hidrogen anormale prin structură chimică a bazelor permanent modificată* — guanină metilată, dimeri de timină etc.;

— *erori de sinteză a lanțului complementar datorate ADN-polimerazei.* Într-adevăr din mutante bacteriene caracterizate printr-o rată de mutație mult crescută pentru orice caracter, s-a izolat o ADN-polimerază anormală, care sintetizează catene complementare cu mult mai multe greșeli decît enzima normală;

— *excizarea unei leziuni în ADN și refacerea unei catene greșite* (cu substituții sau deleții) în procesele de sinteză reparatorie.

Caracterul spontan al mutației. Cauzele naturale ale mutațiilor (radiații, peroxizi, greșeli enzimatice etc.) produc modificări ale secvenței într-un moment imprevizibil, într-o pereche de nucleotide sau un segment de ADN, care pot fi localizate în orice punct din moleculă. Apartenența secvenței modificate la o anumită genă este un fenomen întîmplător. Mutația are deci un caracter spontan, fenomenul mutațional fiind distribuit aleator în timp și spațiu genetic — ea poate să apară în oricare genă, în oricare celulă a populației bacteriene, în oricare moment din viața celulei. În celulele bacteriene, în diviziune conținînd mai mulți cromozomi, mutația se produce numai într-o genă a unuia dintre ei, celelalte gene omoloage nefiind afectate de mutație. Modificarea secvenței apare inițial numai în una din cele două catene complementare. Consecința practică a caracterului aleator în timp constă în posibilitatea recunoașterii naturii fenotipice sau mutaționale a unei variații, cu ajutorul unor experimente bazate pe un raționament statistic (de exemplu, testul fluctuației frecvenței mutantelor Luria-Delbrück). Chiar în cazul mutațiilor induse, cînd intervalul de timp în care se produce mutația poate fi aproximat mult mai precis decît în cazul mutațiilor naturale, același agent mutagen produce într-o celulă mutația unei gene, în timp ce în altă celulă o altă mutație în altă genă. Mutația nu este un act de răspuns specific al unei gene la un anumit factor din mediu. Mutantele apar continuu, cu o anumită rată de producere, astfel încît este posibil să fie identificate și selectate, fără ca în mediul de cultură în care apar să introducem factorul de selecție (de exemplu, testul însămînțării replicative Lederberg). Capacitatea de a suferi mutații este o proprietate a lumii vii.

Transferul de material genetic și recombinarea

Se cunosc trei modalități principale prin care materialul genetic al unei celule bacteriene (donator) poate ajunge într-o altă celulă (receptor) (tabel 1.23): *transformarea, conjugarea* și *transducția.* Aceste procese au cîteva caracteristici comune: transferul se face unidirecțional (donator—receptor); fragmentul de cromozom străin (exogenot) rămîne cîtva timp alături de ADN al receptorului (endogenot), realizînd o diploidie parțială, un merozigot; exogenotul se stabilizează în receptor fie în urma recombinării cu endogenotul, fie ca replicon autonom.

Recombinarea. Pentru interacțiunea dintre două secvențe ADN s-au propus mai multe mecanisme moleculare (fig. 1.46), dintre care la bacterii se întîlnesc mai probabil cel de rupere și reunire și cel de asimilare

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.23

Transferul intercelular de material genetic (donator — receptor)

Fenomen	Mod de transfer	Condiţii	Fixarea exogenotului în receptor	Celula rezultată	Distribuţia în lumea bacteriană
Transformare	Fragmente ADN libere în mediu	Receptor-stare de competenţă	Recombinare omoloagă	Transformant	Mai ales gram +
Conjugare	Contact celular (punte de legătură)	Donator-plasmidă conjugantă	— Plasmidă autonomă — Recombinare	Transconjugant	Bacili gram — Unele gram +
Transducţie	În capsida virionului fagic	Donator fag temperat	Recombinare	Transductant	Orice gen bacterian

Fuziune protoplaşti sau sferoplaşti — amestecul întregului material celular ; cunoscut pînă acum numai ca fenomen de laborator.

a catenei, jucînd un rol diferit în una din cele trei clase de recombinare: a. *omoloagă,* generală — se petrece între regiuni care au în cea mai mare parte aceeaşi secvenţă de nucleotide (de exemplu, în fenomenul de transformare); există cîteva gene bacteriene (rec) necesare pentru recombinare; b. *situs-specifică* — omologia este restrînsă la cîteva nucleotide, loc de ataşare, prezente pe cele două molecule care se recombină (de exemplu, integrarea profagului); c. *nelegitimă* — sau prin IS. Recombinarea omoloagă s-ar produce, mai ales, prin asimilarea catenei, iar cele situs-specifică eventual şi nelegitimă, prin rupere şi reunire.

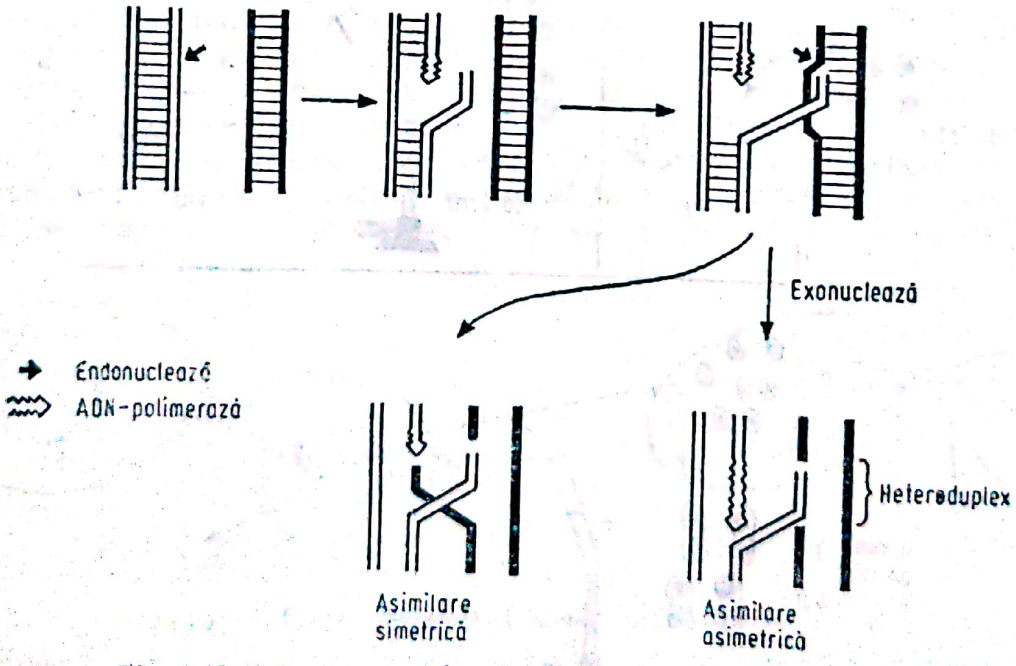


Fig. 1.46. **Schema mecanismului molecular al recombinării.**
— *Asimilare simetrică* — fiecare moleculă incorporează cîte o catenă a celeilalte molecule, ambele avînd o zonă heteroduplex.
— *Asimilare asimetrică* — numai una din molecule primeşte o catenă de la cealaltă moleculă.

Scanned with OKEN Scanner

Transformarea

Fenomenul a fost descoperit de Griffith (1928) în cursul experienţelor în legătură cu patogenitatea pneumococului. Pneumococii virulenţi se dezvoltă pe medii în culturi S şi au capsulă polizaharidică aparţinînd unuia din cele 80 tipuri antigenice diferite S_I, S_{II}... Înoculaţi la şoareci produc o septicemie mortală (fig. 1.47). Pe mediile de cultură, pneumococul dă naştere la colonii R, cu bacterii nevirulente, fără capsulă $R_{(I)}$, $R_{(II)}$ ..., care nu îmbolnăvesc şoarecele. Administrarea concomitentă de pneumococ R viu şi S omorît prin căldură produce o septicemie mortală, din care se izolează pneumococ capsulat. Capsula provine de la pneumococul omorît întrucît la administrarea S_{III} omorît şi $R_{(II)}$ viu se izolează S_{III}. Transformarea tipului de pneumococ a fost explicată de Avery, Mc Carty şi Mac Leod care au arătat că din celula omorîtă prin căldură se poate extrage chimic sau se eliberează fragmente de ADN, cu o greutate moleculară de ordinul 10^6 daltoni, care pătrund în pneumococul viu, restabilindu-i capacitatea de sinteză a capsulei în urma recombinării cu cromozomul. Fenomenul se produce în mai multe stadii şi este condiţionat iniţial de capacitatea celulei receptoare de a transporta în citoplasmă fragmentul de ADN din mediu (competenţă).

Transformarea a fost descrisă pentru mulţi markeri metabolici, rezistenţă la antibiotice etc. atît la pneumococ cît şi la alte specii şi genuri:

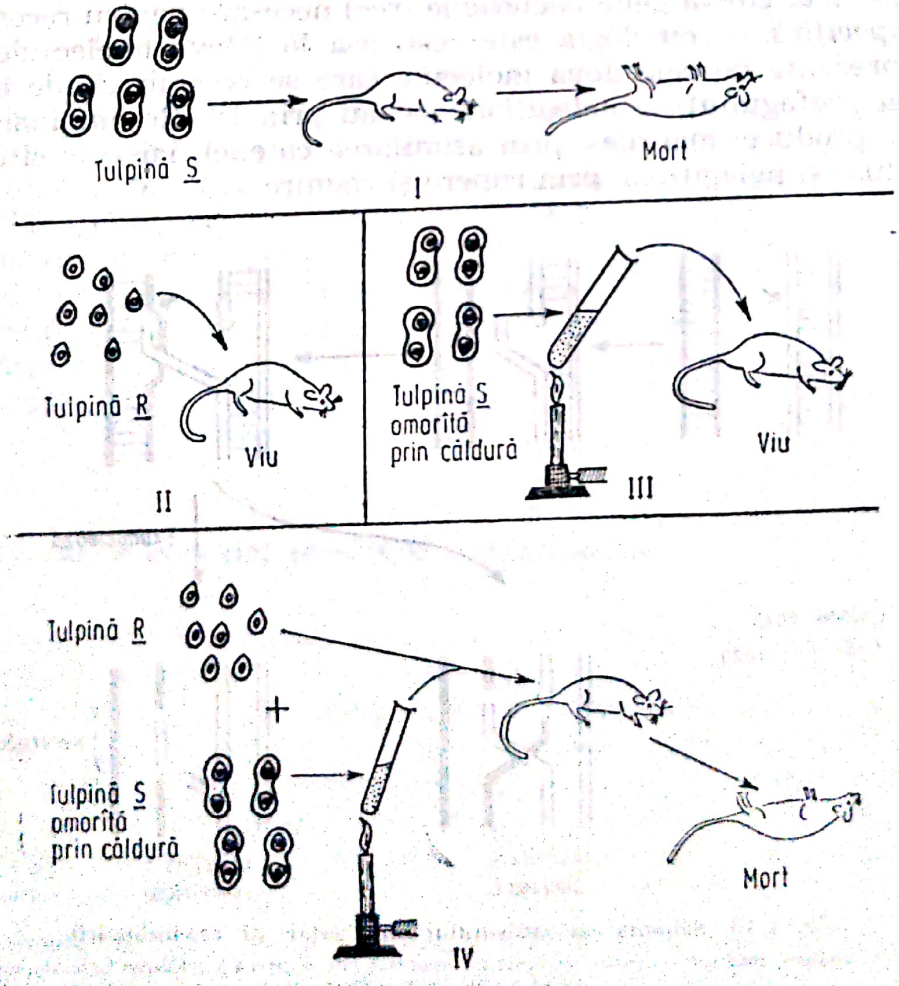


Fig. 1.47. Reprezentarea schematică a transformării.

streptococi, hemophili, neisserii, genul *Bacillus* şi cu unele modificări de tehnică la *E. coli*. La această bacterie transformarea constituie una din metodele de introducere în celulă a unui ADN hibrid, pentru clonare moleculară. În natură însă, transformarea pare restrînsă de condiţiile speciale în care se produce eliberarea de fragmente ADN din donator, absenţa în mediu a nucleazelor care ar putea degrada aceste fragmente etc.

Conjugarea

A fost descoperită de L e d e r b e r g şi T a t u m (1946). În conjugare transferul are loc între celule aflate în contact, printr-o punte de legătură, de la o celulă donator, masculină, fertilă, avînd un factor de sex, la o celulă receptor, feminină, fără factor de sex. Primul factor descoperit a fost plasmida F, apoi plasmidele R, Col. Conjugarea a fost descrisă la bacili gramnegativ în primul rînd, enterobacterii, pseudomonas etc. În ultimul timp a început să fie cunoscută şi la streptococi.

Conjugarea la bacilii gramnegativi. Genele tra din plasmidele conjugante specifică pili de sex pe celula masculină, prin care aceasta aderă de receptori de pe suprafaţa celulelor feminine, formîndu-se perechi specifice. Apropierea celor două bacterii permite formarea unei punţi citoplasmatice (perechi eficiente). Concomitent începe replicarea conjugativă a moleculei de ADN după modelul rolling circle şi transferul copiei prin canalul de legătură. În conjugarea în care în celula masculină plasmida este autonomă de exemplu, $F^+ \times F^-$ se transferă numai plasmida, receptorul devenind la rîndul său fertil (fig. 1.48). Dacă celula masculină conţine plasmida integrată (de exemplu, $Hfr \times F^-$) se transferă în ordine gene cromozomiale, transconjugaţii fiind recombinanţi omologi pentru aceste gene (conjugare cu înaltă frecvenţă de recombinare — Hfr). Numai la trecerea întregului cromozom sînt transferate şi genele tra, transconjugantul devenind fertil. Întreruperea mecanică a conjugării şi cercetarea transmiterii în timp a markerilor a permis obţinerea de hărţi genetice, distanţa dintre gene fiind măsurată în minute. Conjugarea prin factor F′ duce la transferul genelor plasmidice şi a celor bacteriene incorporate în epizom. Cum plasmida se replică autonom, genele cromozomiale respective vor fi în dublu exemplar: transductantul este un zigot parţial permanent. Conjugarea determinată de factori R poate duce la transferul întregii plasmide sau numai a componentei RTF sau numai a determinantului r.

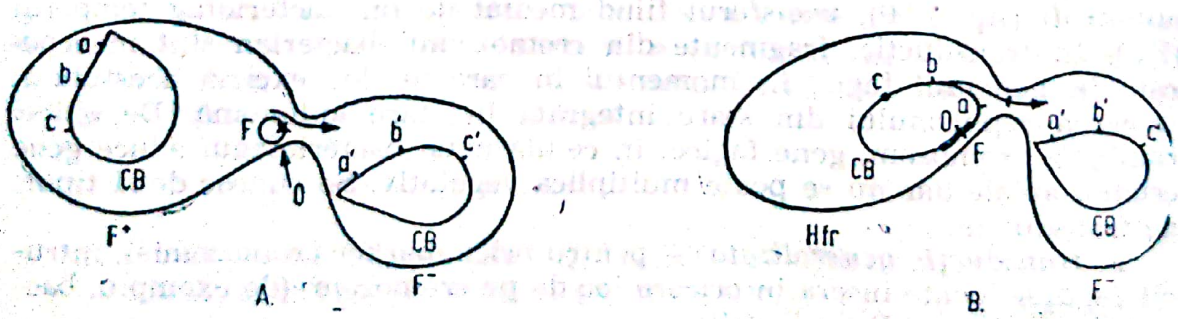


Fig. 1.48. **Schema conjugării la bacterii gramnegative** (*E. coli*):

A — conjugare $F^+ \times F^-$. Transconjugantul primeşte o copie a factorului F şi devine F^+. Nu se transmit gene cromozomiale; *B — conjugare Hfr* $\times F^-$. Transconjugantul rămîne de obicei F^-, întrucît primeşte gene cromozomiale în ordinea poziţiei lor relativ la originea replicării conjugative, operonul Tra fiind ultimul transferat; CB — cromozom bacterian; F — plasmidă F; a, b, c, a′ b′ c′ — gene cromozomiale; O — originea replicării conjugative din plasmida F.

Scanned with OKEN Scanner

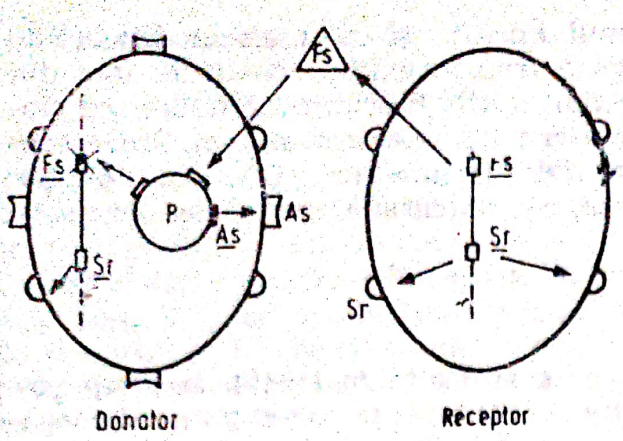


Fig. 1.49. **Modelul conjugării la streptococi.**

Gena cromozomială (*Sr*) determină sinteza unei substanțe receptor (Sr), atît la bacteria donatoare, cît și la cea receptoare. O altă genă (*Fs*) determină sinteza unui feromon de sex (Fs) de către receptor, gena fiind inhibată la donator de către plasmida de conjugare (P). Aceeași plasmidă determină sinteza unei substanțe de agregare (As), ca răspuns al donatorului la prezența în mediu a feromonului de sex (după D. B. Clewell).

Transferul RTF conferă celulei receptor, ca și în cazul transferului factorului F, numai proprietatea de fertilitate. Dacă în receptor există o plasmidă determinant r, se poate reface o plasmidă R, specificînd o altă rezistență. Transferul determinantului r conferă rezistență, dar nu fertilitate. Rezistența este de obicei multiplă, corespunzător genelor prezente în repliconul determinant r.

Conjugarea la streptococi este mediată de plasmide conjugative, ca de exemplu, p AD_1. Nu s-au evidențiat pili de sex. Rolul lor în conjugare este preluat de un sistem alcătuit din *hormoni de sex* (*feromoni)* secretați de celula receptoare, care activează în donator gena plasmidică, specificînd o *substanță de agregare.* La coliziunea întîmplătoare a celor două tipuri de celule substanța de agregare prinde celula masculină de receptori ai suprafeței celulei feminine (asemănător prinderii pililor în perechile specifice) și activează genele de transfer (fig. 1.49). Transferul ar putea avea loc fie printr-o punte intercitoplasmatică (asemănător conjugării la bacilii gramnegativi), fie traversînd membranele citoplasmatice ale celor două celule în contact (asemănător pătrunderii ADN în transformare).

Transducția

A fost descoperită de Zinder și Lederberg (1952) în timp ce se căuta recombinarea la *Salmonella thyphymurium.* S-a văzut atunci că se pot obține prototrofi în absența contactului dintre celulele mutanților auxotrofi (fig. 1.50), transferul fiind mediat de un bacteriofag temperat (P_{22}). În transducție, fragmente din cromozomul bacterian sînt incorporate în genomul fagic, în momentul în care au loc excizia acestuia și trecerea repliconului din stare integrată în stare autonomă. De obicei rămîn în cromozom, gene fagice; în celula nouă bacteriofagul aduce gene cromozomiale dar nu se poate multiplica vegetativ. Se cunosc două tipuri de transducție:

a. *transducție generalizată* — pentru orice marker cromozomial, întrucît fagul se poate insera în oricare loc de pe cromozom (de exemplu, bacteriofagul P_{22} sau P_1 la *E. coli);*

b. *transducție localizată,* specifică — pentru bacteriofagi care au un singur loc de atașare în cromozomul bacterian (de exemplu, bacteriofagul λ). În acest caz vor fi transferate gene din locurile genetice aflate în apropiere, gal sau bio (v. fig. 1.44).

Scanned with OKEN Scanner

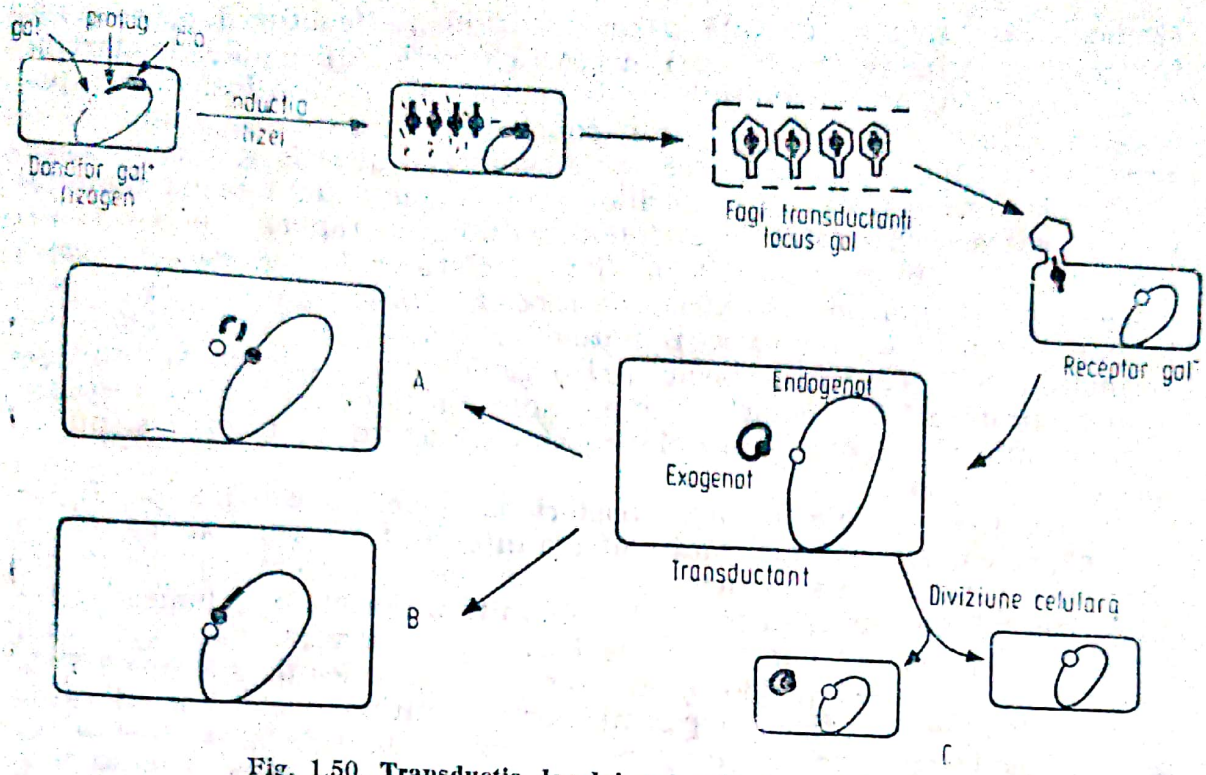


Fig. 1.50. Transducția locului gal prin bacteriofagul λ.

În transductant informația gal⁺ poate persista în mai multe moduri:
A — recombinare omoloagă la nivelul zonei gal, genomul fagic fiind de obicei pierdut;
B — lizogenizare, celula devenind diploidă (gal^+/gal^-). În general genele segregă la descendenți;
C — dacă nu se produce nici una din aceste recombinări, în cursul diviziunilor următoare genomul fagului transductant va fi transmis numai la una din celulele fiice (transducție abortivă).

Transducția a fost studiată la mai multe grupe de bacterii (enterobacterii, stafilococi etc.), dar e posibil ca ea să existe la orice gen bacterian. Dacă mai luăm în considerare faptul că prin acest mecanism se pot transfera și plasmide neconjugative, ca de exemplu, plasmidele de rezistență la antibiotice ale stafilococului, se poate aprecia că transducția ar fi modalitatea de transfer cea mai răspîndită în lumea bacteriană.

Conversia lizogenă constă în apariția unei proprietăți bacteriene noi (conversia proprietății), odată cu lizogenizarea cu un anumit bacteriofag temperat. Determinanții genetici ai acestor proprietăți sînt asociați constant cu genomul fagic, ceea ce deosebește fenomenul de transducție. Astfel de proprietăți bacteriene sînt producerea de toxină la bacilul difteric (lizogenizare cu bacteriofagul β-tox), producerea eritrotoxinei la streptococ, a fibrinolizinei la stafilococ și probabil a exotoxinei la *C. perfringens* tip A, sinteza unor antigene la salmonele (antigen 15 prin bacteriofagul ε_{15}, antigen 34 prin bacteriofagul ε_{34}) ș.a.

1.4.3. ROLUL EREDITĂȚII EXTRACROMOZOMIALE ȘI EVOLUȚIA MATERIALULUI GENETIC LA BACTERII

Evoluția biologică a selectat în lumea bacteriană (lumea cu cea mai lungă perioadă de evoluție) acele forme de organizare și funcționare ale materialului genetic care asigură pe de o parte o cît mai corectă păstrare a identității acestui material, prin replicare, sinteză reparatorie, restricție

și modificare ș.a., pe de altă parte o exprimare fenotipică coordonată, integrată (sistem de transcriere), necesară funcționării celulei bacteriene ca un întreg, cu un consum minim de energie. Se asigură însă și funcționarea mecanismelor evolutive prin fenomene ca transpoziție, duplicare și amplificare genică, mutație, transfer de material genetic și recombinare.

O trăsătură generală a bacteriilor este existența unui bogat material genetic extracromozomial, aflat într-o continuă și rapidă evoluție și jucînd probabil un rol deosebit în viața bacteriilor în natură. Conversia lizogenă reprezintă un caz extrem de asociere constantă a unor gene bacteriene cu un replicon extracromozomial. Dar acești bacteriofagi, împreună cu fagii temperați obișnuiți și plasmide, atrag atenția asupra faptului că proprietățile bacteriene importante din punct de vedere medical, ca virulență, rezistență la antibiotice sînt caractere de tulpină și nu de specie.

În evoluția naturală în lumea bacteriană, genele plasmidice pot fi supuse experiențelor evoluției fără a afecta integritatea cromozomială. Pe de altă parte caracterele specificate de elementele extracromoziale se transmit orizontal, epidemic, răspîndind o anumită proprietate în lumea bacteriană. Este interesant cum plasmide R izolate în diverse părți ale lumii (de exemplu, R100—1 și R6—5) au o omologie genetică de aproape 100%. Se poate spune că existența plasmidelor, permițînd bacteriilor să utilizeze noi substanțe pentru creștere, să reziste la substanțe nocive, să infecteze, le conferă acestora capacitatea de a popula, de a se implanta, de a cuceri noi teritorii naturale.

Este posibilă azi schițarea unei evoluții a materialului genetic bacterian. În cromozom apar secvențe de inserție, a căror transpoziție delimitează regiuni transpozon. Un **transpozon** conținînd un duplicat al originii de replicare se poate desprinde din cromozom și devine un replicon epizomal, posibil ulterior autonom. Recombinarea cu cromozomul, probabil tot prin transpoziție, duce la achiziția unor duplicate ale genelor cromozomiale, duplicate ce pot evolua spre gene noi prin mutație sau recombinare și selecție. Transferul de material genetic duce la răspîndirea acestor gene în lumea bacteriană, ceea ce creează noi posibilități de evoluție.

1.5. ACȚIUNEA FACTORILOR FIZICI ȘI CHIMICI ASUPRA BACTERIILOR

În natură, microorganismele se găsesc numai excepțional în cultură pură. De obicei ele trăiesc în asociații cu alte specii, fac parte din sisteme ecologice și sînt supuse influențelor favorabile sau defavorabile ale factorilor fizici și chimici și a celorlalte forme de viață din biocenoze. Cunoașterea influențelor mediului ajută la explicarea distribuției microorganismelor în natură și stă la baza metodelor de favorizare a multiplicării (izolare pe medii, utilizare industrială a microorganismelor) sau de distrugerea selectivă sau în totalitate (chimioterapie antiinfecțioasă, dezinfecție, antisepsie, sterilizare). Rolul principalilor factori de mediu în multiplicarea bacteriilor a fost discutat în legătură cu metabolismul bacterian (temperatură, pH, oxigen, presiune osmotică etc.).

În cele ce urmează ne vom referi la agenții folosiți în activitatea medicală pentru *sterilizare, dezinfecție* și *antisepsie*. Aceste efecte se obțin

Scanned with OKEN Scanner

prin utilizarea factorilor fizici sau chimici în condiții de intensitate și timp care afectează fie capacitatea de multiplicare, fie viabilitatea microorganismelor. Efectul *bacteriostatic* constă în oprirea multiplicării, este reversibil, astfel că microorganismul care a tolerat acțiunea factorului de mediu își reia multiplicarea la dispariția sau scăderea intensității (concentrației) acestui factor. Efectul *bactericid* constă în producerea unor modificări ireversibile în metabolismul sau structura microorganismului, ceea ce duce la moarte.

Sterilizarea este distrugerea sau îndepărtarea tuturor microorganismelor de pe suprafața sau din interiorul unui corp. Utilizează metode drastice, de obicei fizice (de exemplu, căldură sub diverse forme), prin care se obține un efect bactericid. În particular sterilizarea trebuie să ia în considerare existența sporilor microorganismelor, mult mai rezistenți decît celulele vegetative.

Dezinfecția urmărește distrugerea unor grupe de microorganisme, mai ales a celor patogene, cu ajutorul substanțelor chimice. Dezinfectantele au însă la concentrațiile bactericide o acțiune letală, în grade variate, pentru toate tipurile de celule, fungice, vegetale sau animale; au o toxicitate generală, neselectivă.

Antisepsia (de la *sepsis* — putrefacție a țesăturilor) constă în utilizarea locală, pe țesuturile vii (tegumente, mucoase, plăgi) a unor substanțe care să împiedice multiplicarea bacteriilor sau să le distrugă, fără a fi toxice pentru celulele animale.

Dinamica acțiunii antibacteriene. Sensibilitatea bacteriilor la acțiunea nocivă a factorilor de mediu se distribuie statistic, cu o dispersie mai mare sau mai mică în jurul punctului de sensibilitate medie. Într-o populație bacteriană expusă la un agent letal se produce în timp o reducere progresivă a numărului de supraviețuitori (fig. 151).

Este important faptul că există totdeauna o minoritate de celule care vor supraviețui mult mai mult decît majoritatea celulelor. În consecință, metodele de sterilizare și dezinfecție trebuie să utilizeze agenții fizico-chimici la o concentrație sau un timp mai mari decît cele necesare distrugerii bacteriilor cu sensibilitate medie. Pe de altă parte datele obținute în mediile de cultură trebuie verificate în condițiile reale ale practicii sterilizării și dezinfecției. Factorii adiționali (*p*H, umiditate etc.) modifică efectul antibacterian al factorilor fizico-chimici.

1. **Temperatura** poate fi favorabilă sau defavorabilă microorganismelor, zona temperaturilor de dezvoltare fiind mărginită de temperaturile

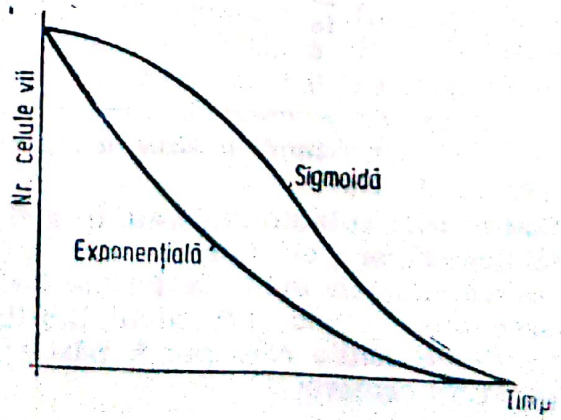


Fig. 1.51. Curba de supraviețuire în timp a bacteriilor supuse unui agent bactericid.

Tabel 1.24

Sensibilitatea bacteriilor mezofile la temperatură. Efect bactericid.

Bacterii	Temperatură	Timp
Treponema pallidum	41,5 °C	60 min
Majoritatea bacteriilor nesporulate, formele vegetative ale bacteriilor sporulate	60 °—65 °C	10—15 min
Staphylococcus aureus	65 °C	30 min
Sporulaţi din genul *Bacillus*	100 °C (fierbere)	15—1200 min
Spori *Clostridium botulinum**	120 °C (autoclav)	5 min
Spori bacterie termofilă**	120 °C (autoclav)	20 min

* 6×10^{10} spori, în tampon la pH 7.
** $1,5 \times 10^{5}$ spori.

extreme: *supramaximale* şi *subminimale*. Temperaturile supramaximale sînt rapid bactericide. Majoritatea bacteriilor mezofile sînt omorîte la 60 °C în 15—30 min (tabel 1.24). Pentru compararea rezistenţei diverselor specii se poate utiliza punctul de moarte termică (temperatura la care efectul bactericid se produce în 10 min) sau mai bine timpul de moarte termică la o anumită temperatură. După cum am arătat numărul de bacterii, *p*H-ul (bacteriile sînt mai rezistente la *p*H neutru), compoziţia mediului (substanţe proteice, lipidice protectoare), ca şi viscozitatea (care poate să întîrzie răspîndirea căldurii în material) influenţează efectul temperaturii. Căldura acţionează prin denaturarea proteinelor şi a altor molecule organice. Foarte importantă din acest punct de vedere este prezenţa apei (tabel 1.25). Absenţa apei libere din spori este responsabilă de rezistenţa lor crescută la temperatură. Cele mai eficace metode de utilizare a căldurii sînt incinerarea (încălzirea la roşu a ansei bacteriologice, incinerarea animalelor de experienţă moarte sau sacrificate etc.), vaporii sub presiune (120 °C, 30 min.), aerul supraîncălzit (180 °C, 1 oră).

Tabel 1.25

Coagularea ovalbuminei în funcţie de gradul de hidratare*

Apă %	Temperatura de coagulare (°C)
50	56
25	75— 80
18	80— 90
6	145
0	160—170

* Timp de încălzire 30 min.

Temperaturile subminimale au, în general, un efect bacteriostatic. Majoritatea bacteriilor pot supravieţui congelate la —190 °C. Dacă se face o congelare rapidă, cu evitarea formării cristalelor de ghiaţă, urmată de sublimarea apei în vid (procedeul liofilizării), supravieţuiesc un număr foarte mare de celule care pot fi păstrate uscate timp îndelungat, chiar la temperatura camerei.

Scanned with OKEN Scanner

2. **Energia radiantă.** Influenţa ei variază cu lungimea de undă (tabel 1.26) şi cu cantitatea totală de energie incidentă. Radiaţiile u.v. sînt bactericide, mai ales, în zona care corespunde spectrului de absorbţie al ultravioletelor de către ADN şi proteine. Efectul lor poate fi anulat de radiaţiile din spectrul vizibil, mai ales cele între 360—510 μm (fotoreactivare).

Tabel 1.26

Efectul energiei radiante

Zona de lungime de undă	Efectul asupra bacteriilor
Infraroşii	— efect termic
Spectrul vizibil — roşu-galben	— indiferent
— albastru-violet	— inhibitor
Ultraviolet (în special 210—310 nm)	— moarte exponenţială
	— mutanţi între supravieţuitori
Raze X, γ	— efect bactericid mai puternic decît u.v.

De exemplu, din 10^6 celule de *E. coli* iradiate u.v. produc colonii la întuneric numai 3—5 celule; dacă sînt expuse la lumină în primele 3 ore după iradiere, pot produce colonii pînă la 10—20% din totalul celor iradiate. Radiaţiile u.v. se utilizează în sterilizare, mai ales, pentru aer şi suprafeţe netede. Radiaţiile *X*, γ se pare că îşi exercită efectul bactericid prin ionizare, cu formarea unor radicali oxigen bactericizi. Se utilizează pentru sterilizarea alimentelor, a unor soluţii medicamentoase sau instrumentar medical.

3. **Ultrasunetele** duc la ruperea peretelui celular şi dezintegrarea structurilor prin cavitaţie. Sînt folosite în laborator pentru obţinerea preparatelor celulare.

4. **Dezinfectantele şi antisepticele** sînt substanţe de diverse naturi chimice care acţionează prin mecanisme variate şi complexe nu numai în funcţie de structura lor chimică, dar şi de componentele celulare cu care reacţionează: aceeaşi substanţă poate fi solvent al lipidelor, poate precipita proteine, acţionînd la suprafaţa bacteriei sau în interior. Efectul lor este în funcţie de concentraţie, timp şi alţi factori dintre care cei mai importanţi sînt: a. *temperatura* — puterea bactericidă se amplifică mult mai mult decît creşterea obişnuită a vitezei reacţiilor chimice cu temperatura de exemplu, o concentraţie de fenol care omoară stafilococul la 10°C în 100 min este bactericid în numai 10 min la 20°C; b. *p*H-ul — influenţează gradul de ionizare a dezinfectantului şi prin modificarea încărcăturii electrice a suprafeţei bacteriene, însăşi sensibilitatea acesteia; c. — *natura microorganismului* — sporii bacterieni sînt cei mai rezistenţi, iar bacteriile capsulate sînt mai rezistente decît cele fără capsulă; d. *umectarea bacteriilor şi solubilitatea suprafeţei în apă* — agenţii tensioactivi, alcoolul cresc efectul antibacterian al altor substanţe; e. *prezenţa altor materiale biologice* (ser, sînge, resturi organice) scade efectul dezinfectantelor.

Dezinfectantele şi antisepticele pot fi grupate după modul principal de acţiune în:

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 1.27

Proprietăţile şi utilizarea unor dezinfectante şi antiseptice

Grup chimic	Exemplu	Proprietăţi importante	Mod de acţiune	Întrebuinţare
		A. Substanţe care produc leziuni ale membranelor celulare		
1. Agenţi tensioactivi — Săpunuri		Săruri de Na şi K; efect bactericid crescut la căldură	Dezorganizare a membranei; cresc permeabilitatea	Spălare — îndepărtarea mecanică a microorganismelor; facilitează acţiunea fenolilor
— Detergenţi (anionici, cationici)		Hidrocarburi, steroli etc. hidrofobi cu un anion sau cation hidrofil; efect crescut la căldură; inhibaţi de săpunuri	Dezorganizare a membranei; pierdere de metaboliţi din celulă.	Spălare — acţiune bactericidă
	Laurilsulfat de sodiu Săruri de amoniu cuaternar	Anion: carboxil, sulfat, etc; mai activ în soluţie acidă Cation: amoniu substituit; mai activ în soluţie alcalină		Medii de cultură selective, omoară bacteriile grampozitive Antiseptic cutanat; bactericid pentru grampozitiv şi gramnegativ
2. Fenoli	Fenoli, crezoli etc.	Scad tensiunea superficială; activitate crescută la căldură, mediu acid.	Bactericid: leziuni în membrană, pierdere de metaboliţi, apoi denaturare şi precipitare de proteine	Dezinfecţie laborator, instrumente etc.
	Hexaclorofen		Bacteriostatic	Inhibă bacterii grampozitive; nu se utilizează la nou născuţi, la care poate fi neurotoxic.
3. Solvenţi organici	Cloroform, toluen		Solubilizare lipide; în concentraţii mai mari denaturare proteine	Menţinere stabilă a unor soluţii
	Alcooli: metilic, etilic, izopropilic etc.	Mai activi în concentraţie de 70—90%	Bacteriostatic şi bactericid	Antiseptic cutanat; în tincturi facilitează acţiunea altor substanţe (iod); nu are efect asupra sporilor.
		B. Substanţe care denaturează proteinele		
4. Acizi	Acizi minerali: sulfuric etc.	Efect proporţional cu gradul de disociere ($pH < 2$)	Distrug pereţi şi membrane celulare, coagulează proteinele	Limitativă (corozivi)
	Acizi organici: benzoic etc.	Slab ionizaţi, pătrund mai uşor în celulă; bactericizi în mediu bazic	Denaturare componente citoplasmatice	Antiseptic blînd; conservant

Scanned with OKEN Scanner

5. Baze	NaOH, $Ca(OH)_2$ etc.	Ioni hidroxil ; efectul nu este inhibat de resturi organice	Distrug perete și membrană	
	C. Substanțe care inactivează grupări funcționale din proteine			
6. Metale grele	Sublimat ($HgCl_2$)	Foarte toxic ; inactivat de material organic	Bacteriostatice în concentrații foarte mici ; reacționează cu gruparea SH.	
	Săruri organice de mercur : Mercasept, mertiolat etc.	Relativ netoxice ; nu sînt inactivate de material organic		Antiseptice ; păstrare produse biologice (seruri etc.)
	Săruri de argint			Antiseptic conjunctival
	Preparate coloidale de argint			Antiseptic conjunctival, prevenirea oftalmiei gonococice la nou născut
7. Agenți oxidanți	Halogeni : — Clor : hipoclorit de Na, Ca ; cloramine	Inactivat de resturi organice. În apă — acid hipocloros, oxidant în mediu acid și neutru.	Bactericid ; oxidează SH. NH_2, resturi indol	Purificarea apei
	— Iod			Antiseptic cutanat, ca tinctură (bactericid)
	Apă oxigenată (H_2O_2)	Instabilă	Bacteriostatic	Antiseptic în plăgi
8. Agenți alchilanți	Formaldehidă, oxid de etilen, glutaraldehidă	Reacționează cu NH_2 și OH	Bactericid în concentrații mari ; reacționează cu proteine, acizi nucleici	Dezinfecția camerelor contaminate ; distruge și sporii
9. Coloranți	Acridine (proflavine)		Bacteriostatici, bactericizi	Antiseptice în plagă
	Coloranți de anilină (cristal violet)	Afinitate pentru grupul fosfat din nucleoproteine	Bacteriostatici, bactericizi	Antiseptic cutanat ; în medii de cultură inhibă bacteriile grampozitive

Scanned with OKEN Scanner

1. *agenți care interferează cu funcțiile membranei celulare;*
2. *agenți care denaturează proteinele;*
3. *agenți care inactivează proteinele prin interacțiune cu grupări funcționale din moleculă* (tabel 1.27). Dezorganizarea membranei are ca efect interferența cu transportul activ și metabolismul energetic, dar și eliberarea din celulă a unor metaboliți esențiali sau facilitarea pătrunderii substanțelor toxice. Acționează în acest mod agenți tensioactivi care reacționează, în primul rînd, cu lipidele din membrană (săpunuri și detergenți sintetici), dar și cîteva grupe de substanțe care produc precipitarea sau denaturarea proteinelor nu numai din membrană, dar și din citoplasmă: fenoli, solvenți organici, acizi și baze. Pentru substanțele care reacționează cu grupări funcționale din enzime, modul de acțiune este specificat în tabel. Menționăm că unele antiseptice pot fi întrebuințate în terapia infecțiilor de suprafață (plăgi, tegumente, mucoase), în care sînt de preferat antibioticelor.

1.6. CHIMIOTERAPIA ANTIBACTERIANĂ

Descoperirea și producerea industrială a chimioterapicelor antibacteriene și utilizarea lor rațională în practica medicală au constituit un mare succes al activității medicale, avînd ca rezultat principal reducerea mortalității prin bolile infecțioase, cu contribuție importantă în creșterea duratei medii de viață.

Antagonismul microbian a fost intuit încă de la începuturile microbiologiei de Pasteur și V. Babeș, dar a rămas fără aplicații practice pînă în 1929, cînd Fleming a evidențiat activitatea antibacteriană a produsului de metabolism al mucegaiului *Penicillium notatum,* căruia i-a dat denumirea de penicilină. Aceasta a fost purificată de Florey și Chain în anii 1939—1940 și astfel introdusă în terapia medicală. Paul Erlich este considerat întemeietorul chimioterapiei antiinfecțioase, nu numai fiindcă a descoperit că Neosalvarsanul (compus organic de arsen) are efect terapeutic în sifilis, ci mai ales, deoarece a stabilit principiul acțiunii selective a chimioterapicelor. Se înțelege prin aceasta că o substanță chimioterapică trebuie să acționeze în doze cu mult mai mici față de bacterii, decît dozele care au efect toxic. Tot el a arătat pericolul instalării rezistenței la chimioterapice. Aceste cercetări au fost continuate de Domagk care în 1935 a dovedit că Prontozilul, prima sulfamidă, are o acțiune largă antibacteriană.

Se schițează din acestea că terapia antiinfecțioasă s-a dezvoltat pe două căi distincte: 1. *chimioterapice propriu-zise,* substanțe de sinteză chimică și 2. *antibiotice,* substanțe obținute prin purificarea unor produși de metabolism bacterian. S-au dovedit bune producătoare de astfel de substanțe mucegaiurile *(Penicillium, Cephalosporium, Streptomyces),* și unele bacterii, în special din genul *Bacillus.*

În prezent o astfel de diviziune nu-și mai găsește justificarea, datorită faptului că au mecanisme similare de acțiune, că unele antibiotice, după ce au fost izolate prin producție microbiană, au fost sintetizate chimic (Cloramfenicolul) și că multe din antibioticele folosite azi sînt obținute prin semisinteză. La aceeasta se adaugă efectul lor predominant bacteriostatic.

Scanned with OKEN Scanner

Un **chimioterapic** sau **antibiotic** se poate defini astfel: orice substanţă care manifestă o acţiune antibacteriană, împiedecînd multiplicarea în doze mici, printr-o acţiune selectivă asupra bacteriilor, la nivel molecular, interferînd specific o cale metabolică; calea metabolică respectivă trebuie să fie absentă în organismul uman sau să nu fie influenţată datorită unor particularităţi structural-funcţionale. Chimioterapicele au efect principal bacteriostatic, însoţit uneori de efect bactericid sau litic.

Trebuie menţionat că pe lîngă chimioterapia antibacteriană s-au dezvoltat în mod similar *chimioterapia antifungică* (antimicotică), *antivirală* şi *citostatică* (antitumorală).

Spectrul de acţiune al chimioterapicelor este reprezentat de *totalitatea speciilor* asupra cărora are acţiune un chimioterapic. Se disting astfel *chimioterapice cu spectru larg* (bacterii grampozitive şi negative) sau cu *spectru restrîns* (mai ales, bacterii grampozitive sau gramnegative sau puţine specii de bacterii).

1.6.1 FAMILII DE CHIMIOTERAPICE

Chimioterapicele au fost clasificate după criterii variate: originea, structura chimică, mecanismul de acţiune, efectul principal bacteriostatic sau bactericid, spectrul de acţiune etc. O ordonare care să corespundă scopului terapeutic este cea care le grupează în familii, o familie reunind chimioterapicele care au criteriile de clasificare amintite asemănătoare. Ţinînd seama şi de spectrul de acţiune ele pot fi grupate astfel (tabel 1.28):

A. *familii cu spectru larg de acţiune:* aminozide, Tetracicline, Cloramfenicol, sulfamide, nitrofurani;

B. *familii cu poziţie particulară* (iniţial produşi cu spectru restrîns din care s-au obţinut derivaţi cu spectru larg): betalactamine, rifampicine;

C. *famili cu spectru restrîns:* macrolide, polimixine, tuberculostatice;

D. *chimioterapice diferite* (nu pot fi grupate pe criteriile enunţate): Bacitracina, Gramicidina, acid nalidixic etc.

În figura 1.52 este redată structura chimică a principalelor antibiotice,

1.6.2. MECANISMUL DE ACŢIUNE

Manifestarea efectului toxic selectiv al chimioterapicelor se poate preciza prin mecanismul intim prin care acesta se realizează şi care, în principal, poate îmbrăca două aspecte diferite:

a. chimioterapicul se fixează — ireversibil sau reversibil — pe o anumită moleculă sau tipuri de molecule, blocînd participarea acesteia (acestora) în biosinteza macromoleculelor şi structurilor vitale ale celulei. Moleculele cu care interacţionează antibioticele reprezintă în consecinţă receptori ai acestor substanţe;

b. chimioterapicul prin structura şi conformaţia sa moleculară acţionează ca un antagonist competitiv.

Scanned with OKEN Scanner

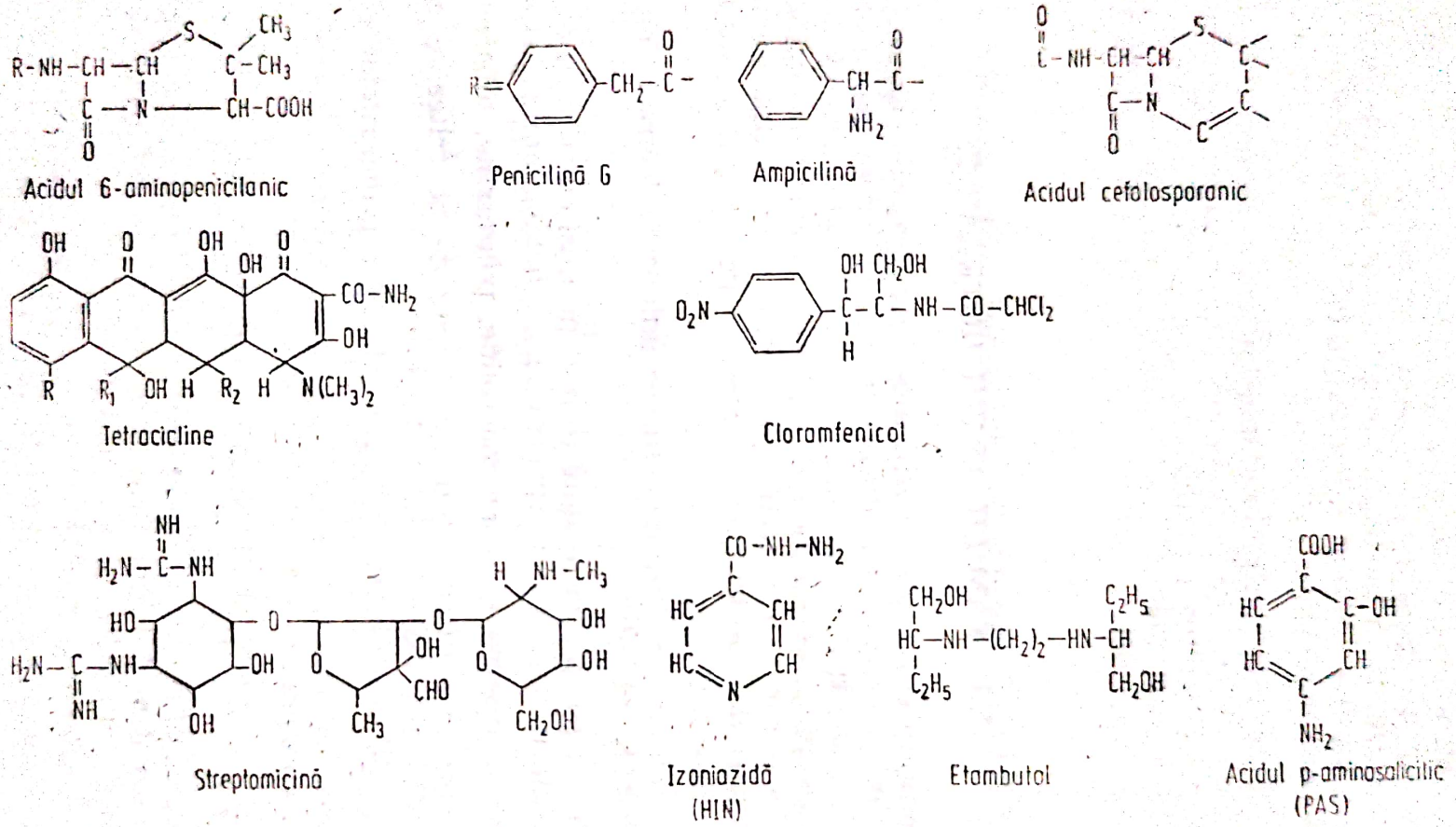


Fig. 1.52. Formula chimică a principalelor chimioterapice.

Tabel 1.28

Familii de chimioterapice

Familia	Reprezentanți
I. *Familii cu spectru larg*	
1. Aminozide	Streptomicina, kanamicina Neomicina, Gentamicina, Amikacina, Tobramicina
2. Tetracicline	Tetraciclina, Doxiciclina (vibramicina) Clortetraciclina (Aureomicina) Oxitetraciclina (Terramicina), metaciclina etc.
3. Cloramfenicol	Cloramfenicol, thiamfenicol
4. Sulfamide	Sulfatiazol, Sulfafurazol Biseptol (sulfamidă + trimetoprim) sulfamide de depozit: Ftalilsulfatiazol, Talazopirina
5. Nitrofurani	Furazolidon, Nitrofurantoin
II. *Familii cu poziție particulară*	
1. Betalactamine	*Peniciline:* Penicilina G, Penicilina V Oxacilina, Ampicilina Amoxiciclina (amoxyl) Carbenicilina (piopen) *Cefalosporine:* Cefalotina, Cefalexina, Cefradina
2. Rifamicine	Rifamicina (Sinerdol)
III. *Familii cu spectru restrîns*	
1. Macrolide	Eritromicina, Oleandomicina
2. Polipeptide ciclice	Polimixina B, Colimicina
3. Tuberculostatice	Kanamicina, Streptomicina, Rifamicina, PAS Etionamida, Etambutol, Hidrazida acidului izonicotinic
IV. *Chimioterapice diferite*	Acidul nalidixic (Negram) Bacitracina, Gramicidina, Metronidazol (bacterii anaerobe)

Pe un alt plan, fiecare antibiotic, prin una din cele două modalități anterioare, își exercită efectul asupra unor structuri sau formațiuni țintă cu funcții indispensabile în creșterea și diviziunea celulară (fig. 1.53).

Chimioterapice care împiedecă sinteza peretelui celular

Familia β-lactaminelor acționează în stadiul final al sintezei peptidoglicanului, blocînd activitatea transpeptidazelor care realizează legătura interpeptidică dintre diaminoacidul din poziția 3 dintr-o unitate de bază de pe o catenă cu *D*-alanina din poziția 4 dintr-o unitate de bază de pe o catenă învecinată, cu eliminarea *D*-alaninei din poziția 5. Aceasta se datorește faptului că între betalactamine și *D*-alanil-*D*-alanină din peptidul unității de bază, substratul transpeptidazei, există o asemănare de conformație. În consecință antibioticul se leagă cu centrul activ al enzimei și o inactivează. De asemenea betalactaminele inactivează și carboxipepti-

Scanned with OKEN Scanner

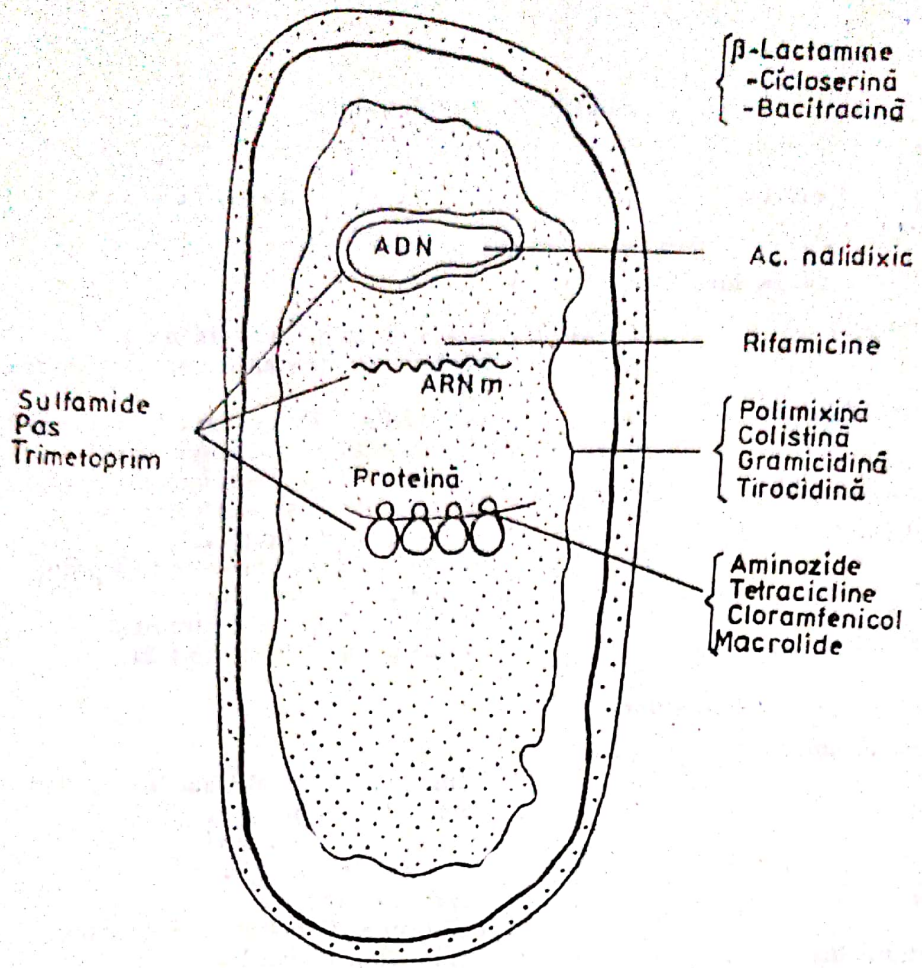


Fig. 1.53. Structurile „țintă" din celula bacteriană asupra cărora acționează antibioticele.

daza, care elimină *D*-alanina din poziția a 5-a din peptidul unităților de bază nelegate interpeptidic. În plus s-a văzut că aceste antibiotice se leagă de mai multe proteine din celulă. Unele din acestea pot fi activatorii autolizinelor din peretele celular, favorizîndu-se în felul acesta liza peretelui. Ca o consecință a acestor efecte se formează protoplaști și sferoplaști, care în condiții obișnuite de mediu se lizează, explicîndu-se în felul acesta acțiunea bactericid-litică a lactaminelor.

Un alt chimioterapic — *cicloserina* — inhibă sinteza unității de bază. *D*-cicloserina, ca analog structural al *D*-alaninei, împiedică competitiv activitatea alanin-recemazei și *D*-alanin-*D*-alanină-ligazei, avînd pentru aceste enzime o afinitate cu mult mai mare (pînă la 200 de ori mai mare) decît substratele naturale. În felul acesta este blocată formarea pentapeptidului și perturbată, în final, sinteza peretelui celular.

Bacitracina acționează indirect în sinteza peretelui celular, prin împiedecarea trecerii prin membrana citoplasmatică a precursorilor peptidoglicanului, mai ales prin acțiunea asupra unor lipide cu rol de transportor al acestora (carrier lipid).

Chimioterapice care acționează asupra membranei citoplasmatice

Acestea interferează două funcții importante:

— *Gramicidina* și *tirocidina* modifică funcția energetică a membranei, acționînd ca decuplanți, afectînd în felul acesta respirația celulară;

Scanned with OKEN Scanner

— *polipeptidele ciclice* — *polimixinele* și *colistinele* — abolesc funcția de membrană selectivă și barieră osmotică a membranei citoplasmatice. În consecință se modifică compozițiile interne ale celulei, din aceasta eliberîndu-se nucleotizi, proteine, coenzime etc., perturbîndu-se întreg metabolismul celular, ceea ce duce la moartea celulei. Structura țintă din membrană pare să fie fosfatidil-etanolamina.

Chimioterapice care acționează asupra aparatului genetic

Citeva chimioterapice, mai ales citostatice cum este *mitomicina* (chimioterapic antitumoral), împiedică sinteza acizilor nucleici, legîndu-se între cele două catene; blochează replicarea ADN-ului la celule procariote și eucariote.

Dintre chimioterapicele antiinfecțioase *acidul nalidixic* acționează printr-un mecanism asemănător.

Rifamicinele împiedecă sinteza ARN-m-ului, deci transcrierea informației genetice, prin legarea de ARN-polimeraza-ADN dependentă liberă și o inactivează. Atașarea în proporție de moleculă antibiotic/moleculă de enzimă este suficientă pentru inhibarea sintezei ARN-m. Poziția de legare a antibioticului este localizată pe corpul enzimei, suficient de multe dovezi precizînd că această poziție se găsește pe una din subunitățile beta.

Antibiotice care inhibă sinteza proteinelor

Antibiotice cu acțiune pe subunitatea 30 S. 1. *Aminozidele* alterează funcția acestei subunități prin legarea de o structură în care proteina 10 (P_{10}) (una din cele 19 proteine izolate și identificate) reprezintă receptorul principal. Efectul major al aminozidelor constă în modificări conformaționale ale ribozomului, ceea ce duce la o pronunțată creștere a *citirii greșite* a codului genetic, rezultînd proteine nefuncționale *(nonsens* mai ales). Se adaugă apoi și inhibarea sintezei proteice prin împiedecarea asamblării ribozomului și prin formarea unor monozomi 70 S stabili și inhibarea formării polizomilor (aceasta explică efectul bactericid al aminozidelor). Unele aminozide cu efect predominant bacteriostatic, ca spectinomicina, se leagă de o altă poziție din subunitatea 30 S, în care se găsește o proteină diferită (P_4).

2. *Tetraciclinele* se leagă preferențial de subunitatea 30 S, dar în mai mică măsură și de 50 S. Ele împiedecă legarea aminoacil-ARN-t de complexul ARN-m și subunitatea 30 S, fiind în special, afectată legarea f-Met-ARN-t. Este blocată sinteza proteică mai ales în faza de inițiere, dar și de elongare.

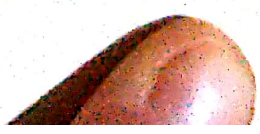
Antibiotice cu acțiune pe subunitatea 50 S. 1. *Cloramfenicolul* inhibă formarea legăturii peptidice, acționînd asupra peptidiltransferazei.

2. *Macrolidele* și *antibioticele asemănătoare* interferă cu formarea complexului de inițiere a sintezei lanțului polipeptidic, împiedicînd de asemenea translocarea și transpeptidarea.

Chimioterapice care inhibă indirect sinteza acizilor nucleici și a proteinelor

Sulfamidele, PAS-ul, trimetroprimul și probabil, derivații nitrofuranici își exercită acest efect prin interferență cu unii factori solubili.

Sulfamidele inhibă multiplicarea bacteriilor care-și sintetizează acidul folic, deoarece acționează prin antagonism competitiv cu acidul paraaminobenzoic (PABA) în sinteza acidului tetrahidrofolic. Precursorii pteridinici (fig. 1.54) sînt condensați cu PABA pentru a forma



Scanned with OKEN Scanner

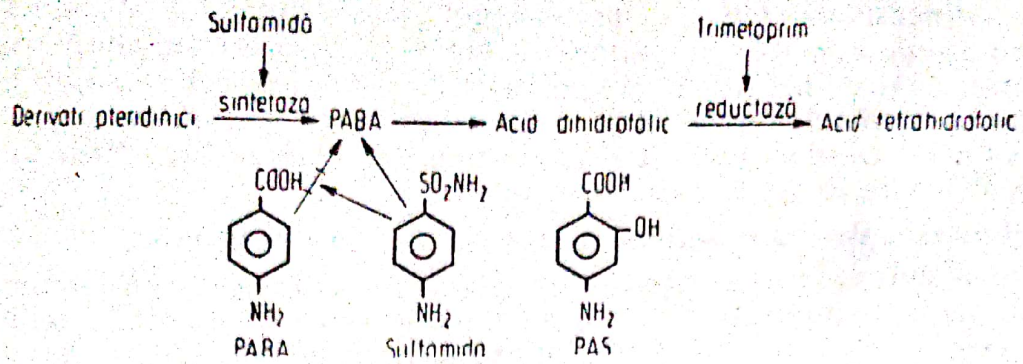


Fig. 1.54. Mecanismul de acțiune al sulfamidelor și acțiunea sinergică a trimetoprimului.

dinici (fig. 1.54) sînt condensați cu PABA pentru a forma acidul dihidropteroic. Centrul activ al enzimei are afinitate mare pentru PABA datorită analogiei de structură și este blocată astfel sinteza acidului tetrahidrofolic.

La bacilul tuberculos, sintetaza are afinitate numai pentru PAS, acesta fiind în consecință un bun tuberculostatic. Prin interferența cu sinteza acidului tetrahidrofolic se aboleşte funcția de coenzimă a acestuia în transferul grupărilor metil (C_1), reacție ce intervine în sinteza metioninei (și indirect a proteinelor), a timinei și purinelor și prin acestea în sinteza acizilor nucleici.

Trimetoprimul (3,4,5-trimetoxibenzil pirimidina) inhibă tetrahidrofolatreductaza (este de 1000 de ori mai sensibilă cea de la bacterii decît cea de la om), blocînd sinteza tetrahidrofolatului într-o etapă ulterioară (v. fig. 1.54). De aceea asociația sulfamidelor cu trimetoprim are un puternic efect sinergic, acționînd în aceeași cale metabolică.

1.6.3. CÎȘTIGAREA REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICE

Apariția variantelor rezistente în cadrul speciilor ce intră în spectrul de acțiune al unui antibiotic dat reprezintă una din cele mai alarmante și dificile probleme cu care este confruntată chimioterapia antiinfecțioasă și, în general, practica medicală. Față de toate chimioterapicele și aproape la toate speciile bacteriene au apărut după utilizarea lor, cu rapiditate și grade diferite, variante rezistențe.

La instalarea rezistenței, speciile bacteriene au un comportament inegal. Unele au o mare capacitate de a deveni rezistente, după perioade de timp relativ scurte de utilizare a unui antibiotic, cum sînt stafilococul, enterobacteriile și alți bacili gramnegativi (în special, *Pseudomonas*). La alte specii rezistența apare ca o raritate. Astfel, streptococul beta-hemolitic a rămas pînă azi constant sensibil la peniciline.

Rezistența la antibiotice, ca fenomen de variație, apare prin mecanismele genetice responsabile de modificări în informația ereditară. De aceea ea poate fi: cromozomială și extracromozomială (fig. 1.55).

Rezistența cromozomială se distinge printr-un nivel ridicat și stabilitate, cu o modalitate de exprimare fenotipică caracteristică.

Rezistența extracromozomială, plasmidică, este, de obicei, de nivel mai scăzut și poate fi pierdută în condițiile care favorizează eliminarea plasmidelor din celulă. Importanța remarcabilă a acestei rezistențe constă în

Scanned with OKEN Scanner

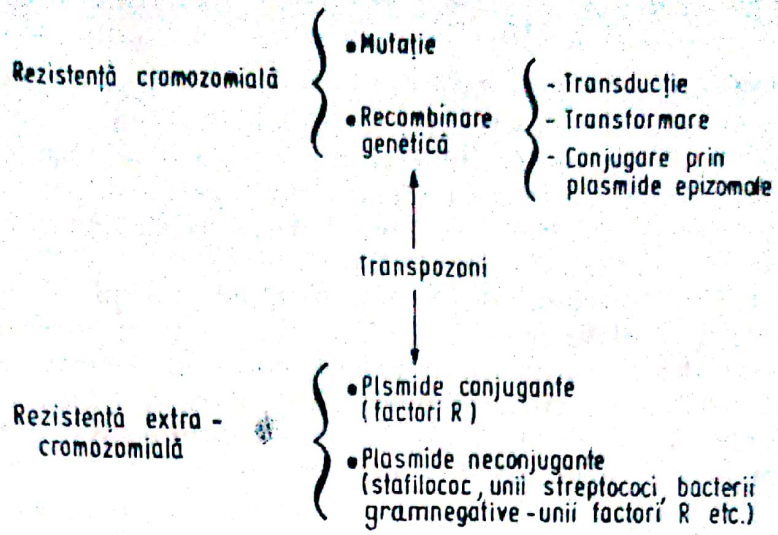


Fig. 1.55. Dobîndirea rezistenței la antibiotice.

transmiterea ei, „infecțioasă", prin conjugare și mai ales, în transferul în bloc de rezistență la mai multe antibiotice. Transferul plasmidelor neconjugante se poate realiza prin cointegrare cu o plasmidă conjugantă sau prin transducție. Ea se exprimă fenotipic prin mecanisme proprii.

Este dificil de făcut aprecieri generale asupra importanței diferitelor mecanisme de cîștigare a rezistenței. Aceasta depinde de antibiotic, existînd între acestea unele pentru care nu s-a descris rezistență plasmidică, de exemplu, acidul nalidixic și în mai mare măsură de specia bacteriană. Cu aceste limitări se poate considera că mutația, prin caracterul ei universal, interesează toate antibioticele și speciile bacteriene, dar ca frecvență, rezistență dată de plasmide, deține evident ponderea cea mai importantă.

Între rezistența cromozomială și cea plasmidică se poate face un schimb reciproc de determinanți genetici de rezistență prin intervenția transpozonilor, ceea ce face ca demarcația dintre acestea să se șteargă într-o oarecare măsură.

Mecanismele biochimice ale exprimării fenotipice a rezistenței. Mecanismele genetice ale rezistenței cromozomiale determină în principal, modificări ale pozițiilor țintă (receptorilor) asupra cărora acționează fiecare antibiotic, în așa fel încît ele își păstrează funcția pe care o dețin în celulă, dar își pierd afinitatea pentru antibiotic. Astfel, streptomocinorezistența se datorește unei modificări a P_{10}, în cazul rifamicinei, a ARN-m-polimerazei etc.

Pentru rezistența cu determinism plasmidic, mecanismul principal îl constituie *inactivarea enzimatică a antibioticelor:* betalactamazele (penicilinazele) care scindează nucleul betalactamic sau cefalosporinic, acetilaze și fosforilaze, care, prin introducerea radicalilor respectivi, inactivează aminozidele, cloramfenicolul, ș.a.

Un alt mecanism îl constituie *modificări în permeabilitatea membranei citoplasmatice,* în așa fel încît celula devine impermeabilă față de antibiotic sau nu se asigură concentrarea selectivă endocelulară a antibioticelor (tetracicline, macrolide ș.a.)

Scanned with OKEN Scanner

1.6.4. INERRELAȚII CHIMIOTERAPIE-BACTERIE-ORGANISM GAZDĂ

Instaurarea chimioterapiei trebuie să constituie un act de gîndire și responsabilitate medicală, fundamentat pe cunoașterea aprofundată a mecanismelor de acțiune și de cîștigare a rezistenței specifice fiecărui antibiotic. Se adaugă la acestea înțelegerea interrelațiilor complexe dintre antibiotic și bacterie, acestea și parametrii găsiți în organismul uman în condițiile caracteristice ale infecției.

Primul moment important în chimioterapie îl constituie stabilirea necesității acesteia prin argumente care să demonstreze evoluția unei *infecții bacteriene*. Se impune o regulă care nu permite nici o excepție: **nu se instaurează un tratament cu chimioterapice fără un diagnostic precis al infecției bacteriene.** A prescrie un chimioterapic fără a cunoaște etiologia unei febre, înseamnă o *eroare:*

— în unele cazuri, *minimă,* constituind un tratament inutil, dar costisitor, cu posibilitatea apariției efectelor secundare ale chimioterapiei;

— în alte cazuri, *maximă,* tratamentul putînd masca o infecție gravă (apendicită, endocardită lentă) sau favoriza printr-o intervenție nefundamentată științific instalarea unor complicații grave. Chiar în cazurile grave, nimic nu justifică începerea chimioterapiei înainte de recoltarea produselor patologice necesare diagnosticului etiologic. Trebuie apoi subliniat că toate chimioterapicele prezentate sînt lipsite complet de activitate asupra virusurilor și deci, ineficiente în infecțiile virale.

O terapie nerațională cu antibiotice favorizează și amplifică selectarea, mai ales în mediu spitalicesc, a variantelor cu rezistență multiplă și înaltă față de chimioterapice, care pot determina infecții intraspitalicești uneori cu evoluție de epidemii.

În diagnosticul etiologic este necesar să se stabilească bacteria care cauzează cu certitudine infecția, fără să se ia în considerare orice bacterie izolată din produsul patologic.

Baza rațională, științifică, a alegerii chimioterapicelor pentru terapie o constituie datele furnizate de **antibiogramă.** Sînt puține infecții în care diagnosticul clinico-etiologic este suficient: infecții cu streptococ de grup A, *Treponema pallidum* (cu sensibilitate constantă la penicilină), rickettsioze. Pentru celelalte bacterii, testările sensibilității cîștigă în timp în valoare, pentru informațiile prețioase pe care le aduc în orientarea terapiei.

În practica curentă cea mai utilizată metodă este cea **difuzimetrică,** care într-o scară convențională, în raport de diametrul zonei de inhibiție, caracterizează într-o măsură acceptabilă gradul de sensibilitate a bacteriei testate. Informații mai prețioase pot fi date de **determinarea concentrației minime inhibante** (C.M.I.), iar în cazurile grave (septicemice) este necesară și **testarea concentrației serice** și, mai ales, nivelul eficienței antibioticului din ser, inclusiv prin *testarea puterii bactericide.* Atunci cînd organismul are un grad redus de capacitate de apărare antiinfecțioasă, este indicat să se testeze efectul bactericid al antibioticelor.

Datele oferite de antibiogramă trebuie apreciate critic, ținînd seama de diferențele ce există între condițiile testării „in vitro" și cele existente în organismul uman. Determinările „in vitro" se fac cu respectarea unor condiții standard. Între acestea una de semnificație majoră este *distribuția uniformă a antibioticului în mediul de cultură.* Apoi bacteriile, fiind într-o stare activă metabolică, ca celule în multiplicare exponențială, își exprimă

Scanned with OKEN Scanner

sensibilitatea maximă. În antibiogramă se lucrează la același *p*H, temperatură, mărime de inocul, timp de incubare, compoziție a mediului.

Spre deosebire de aceasta, în organism, condițiile în care chimioterapicul își exercită efectul antibacterian sînt de o mare diversitate și variație. Bacteriile se multiplică diferit față de mediul de cultură, apreciindu-se că „*in vivo*" au, în general, un timp de generație mai mare, deci o multiplicare mai lentă, fiind posibil ca în anumite focare inflamatorii, să înceteze aproape complet diviziunile celulare. Exprimarea fenotopică, cu precădere cea metabolică, este de asemenea distinctă de cea întîlnită în medii de cultură, ceea ce poate reduce din acțiunea antibacteriană a antibioticelor. În organism pot exista populații de densitate variabilă, ori se știe că antibioticul acționează cu efect maxim, atunci cînd pe unitate de volum (mediu de cultură) există un număr mic de celule. Existența unor populații de mărime crescută favorizează apariția și selecția variantelor rezistente. *p*H-ul din focarul infecțios este de asemenea, variabil. De aceea trebuie să se țină seama de *p*H-ul optim la care acționează fiecare antibiotic, unele chimioterapice fiind mai active la un *p*H acid (nitrofurantoina), altele la un *p*H alcalin (aminoside, sulfamide).

Fiecare familie și fiecare antibiotic au „*in vivo*" o farmacocinetică caracteristică—rezorbție, difuzie, nivel sanguin, nivel în țesuturi și organe, metabolizare și inactivare, de care trebuie să se țină seama în selectarea chimioterapicelor. În organismul uman, asupra bacteriilor acționează condiții variate, după localizarea în diferite organe, țesuturi și lichide biologice, de aceea este necesar să se aibă în vedere localizarea infecției. În raport de aceasta, concentrațiile unui antibiotic vor fi diferite, ceea ce face ca între acțiunea *in vitro* și *in vivo* să apară diferențe. În organismul infectat bacteriile se pot localiza intracelular. Chimioterapicele au o penetrare variabilă în celula umană. Astfel, tetraciclinele ating aceleași concentrații în interiorul monocitelor și lichidul intercelular. La altele nivelul intracelular este mult redus (5—10% la streptomicină). În țesuturile infectate se modifică unii parametri fizico-chimici, care determină activitatea antibioticului (de exemplu, *p*H-ul acid), sau el poate interacționa cu acizii nucleici din puroi: este posibil să fie adsorbit pe detritusuri tisulare, pe celule, pe fibrină, împiedecîndu-se în acest fel contactul lui cu bacteriile. Pereții unui abces sînt avascularizați și de aceea, antibioticul nu pătrunde în focarul de infecție.

O atenție particulară trebuie acordată utilizării chimioterapicelor la gravide și sugari, la care efectul toxic se instalează cu frecvență mai mare și cu repercusiuni mai importante, unele antibiotice afectînd dezvoltarea embrionului și fătului. Se presupune, fără însă a avea dovezi certe, că au efecte teratogene: nitrofurantoină, acid nalidixic, metronidazol.

Pe de altă parte relațiile parazit-gazdă pot fi modificate prin chimioterapie. Astfel, răspunsul inflamator al țesuturilor poate fi suprimat prin acțiunea chimioterapicului fără eliminarea microorganismului din gazdă și în felul acesta un proces acut poate fi transformat într-unul cronic. Tratamentul antiinfecțios, modificînd evoluția infecției, poate altera și răspunsul imun. Efectul antibioticului se exercită nu numai asupra bacteriei care produce infecția, dar și asupra bacteriilor care se găsesc normal în cavitățile deschise ale organismului, modificînd profund microecologia acestora. În felul acesta se abolește cel puțin parțial, funcția jucată de microbiocenoze în apărare față de bacteriile patogene și în plus, unele relații particulare, cum ar fi aprovizionarea organismului cu unele

Scanned with OKEN Scanner

vitamine din complexul B, rezultate din metabolismul bacterian (de aceea este necesară asocierea terapiei cu antibiotice cu spectru larg cu complex B).

Asociații de antibiotice. În majoritatea infecțiilor este indicată o *monochimioterapie*-alegerea antibioticului considerat cu eficiență maximă probabilă pe baza observației clinice și a indicațiilor oferite de antibiogramă. În cazuri particulare, infecții grave generalizate (septicemii, endocardită acută și lentă, meningite bacteriene), în care infecția evoluează pe organisme cu reactivitate imunologică la nivel coborît, se pot asocia două antibiotice cu efect sinergic, de potențare reciprocă a efectului fiecăruia. Asociația de antibiotice își mai găsește o justificare științifică în infecțiile în care chimioterapia are o durată mai mare, împiedecînd selectarea mutantelor rezistente. Exemplul tipic îl constituie tuberculoza și infecțiile mixte plurietiologice.

Chimioprofilaxia este o problemă medicală de amplă controversă. Există condiții speciale epidemiologice (zone puternic endemice, pericol de instalare a unei epidemii, accidente profesionale medicale), în care se poate apela la o profilaxie prin antibiotice. De asemenea sînt unele indicații clinice, chirurgicale, ortopedice, obstetrice, în care se apelează la această metodă, pentru a preveni instalarea unei infecții. Ținînd însă seama de efectul pe care această metodă îl are în selectarea și introducerea în circulație a variantelor bacteriene rezistente, precum și efectele secundare adverse, ea trebue mult limitată și aplicată numai pe criterii obiective, implicînd responsabilitate și competență profesională.

1.6.5. CHIMIOTERAPICE ANTIFUNGICE

Chimioterapicele antifungice au spectru selectiv asupra fungilor, cu acțiune fie în micozele superficiale, fie în cele profunde (sistemice), sau în ambele. Regulile de aplicare a acestor chimioterapice, ca și testarea lor *in vitro* sînt similare cu cele discutate anterior. Sînt obținute fie ca produși de metabolism bacterian (Nistatina din *Streptomyces*, Griseofulvina M din *Penicillium*), fie prin sinteză chimică (Cotrimoxazol, 5-fluorocitozina). Cele mai importante antifungice și date privind spectrul lor de acțiune se pot vedea în tabelul 1.29.

Tabel 1.29

Principale chimioterapice antifungice

	Mod de administrare	Spectru de acțiune
Nistatina	Locală	Candidoze ale mucoaselor
Griseofulvina M	Cale orală	Epidermofiție, favus, microsporie
Cotrimoxazol, miconazol	Local și per os	Micoze cutanate și chiar sistemice *(Candida, Criptococcus neoformans, Coccidioides immitis)*
Amfotericina B	Intravenos	Micoze sistemice *(Histoplasma capsulatum, Blastomyces, Criptococcus, Candida* etc*)*.
Flucitozina (5-Fluorocitozina)	Cale orală	Micoze sistemice *(Candida, Criptococcus, Torulopsis)*

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2
INFECȚIE ȘI IMUNITATE

2.1. RELAȚII ECOLOGICE ALE MICROORGANISMELOR. INFECȚIA

2.1.1. RELAȚII ECOLOGICE ALE MICROORGANISMELOR

Microorganismele sînt alături de toate celelalte organisme vii o componentă a biosferei. Între constituenții acesteia s-au stabilit în cursul evoluției relații multiple conturîndu-se în timp sisteme ecologice. Microorganismele nu le găsim în mod obișnuit în natură ca specii izolate; ele se organizează în dependență de factori multipli, în amestecuri de populații, formînd **microbiocenoze,** sau cum se mai numesc, **microbiota.**

În constituirea acestor microbiocenoze un rol important îl au *relațiile ce se stabilesc între diferite populații de bacterii.* Acestea pot fi de mai multe tipuri: relații **neutrale,** de **simbioză** sau de **sinergism.** Mai importante în structurarea microbiocenozelor, cu un echilibru dinamic între populațiile constituente, sînt relațiile de **antagonism.** Înțelegem prin acesta că unele microorganisme împiedică multiplicarea altor populații de microorganisme. Aceasta poate să se realizeze printr-un antagonism nespecific rezultat din competiția pentru substanțe nutritive din mediu, prin factori nespecifici de metabolism, modificări de *p*H, compuși de metabolism inhibitori etc. Antagonismul specific se datorește elaborării de către o populație bacteriană a unor substanțe cu acțiune specifică față de alte microorganisme, cum ar fi colicinele, sau substanțe de tip antibiotic. La toate acestea mai trebuie adăugat că bacteriile pot fi parazitate de virusuri proprii — *bacteriofagii* — cu care formează un ecosistem particular.

Alte *relații ecologice* sînt cele *dintre microorganisme și factorii de mediu.* În natură unele microorganisme au o răspîndire largă, cu o prezență ubicuitară. Se remarcă însă că în raport cu condițiile existente se constituie microbiocenoze în mare măsură caracteristice pentru aer, apă și sol.

În definirea ecologiei microorganismelor o importanță particulară o au *relațiile cu alte organisme vii, inclusiv omul.* În ce privește raporturile cu omul pot fi microorganisme **saprofite** și **parazite** (facultative și stricte) (tabelul 2.1.).

Tabel 2.1

Clasificarea microorganismelor în raport de relațiile lor cu organismele vii

Grupul de bacterii	Substratele de dezvoltare
Saprofite	Materia organică moartă sau materia anorganică
Parazite stricte	Organisme vii
Parazite facultative	Organisme vii sau materie organică moartă

Scanned with OKEN Scanner

Luînd în considerare capacitatea de a produce infecţii la om se disting:

1. **paraziţi cu patogenitate certă** (sau de ordinul I) a căror prezenţă în organism semnifică, de obicei, boala infecţioasă;

2. **paraziţi oportunişti** (sau de ordinul II), care se găsesc în mod obişnuit ca microorganisme comensale şi rareori, pe organisme cu rezistenţă scăzută sau într-o anumită condiţionare, pot produce îmbolnăviri.

Un tip particular de relaţii îl constituie **comensalismul** în care microorganismele şi gazda trăiesc în asociaţie, fără să se producă efecte nocive. Astfel de microorganisme, în primul rînd bacterii, populează în cîteva ore pînă la cîteva zile de la naşterea omului, tegumentele şi cavităţile naturale deschise ale organismului uman, structurîndu-se o microecologie caracteristică în raport cu condiţiile existente în fiecare dintre aceste regiuni şi în consecinţă microbiocenoze particulare: bucală, faringiană, nazală, de tip colon, tegumentară (tabel 2.2.).

Tabel 2.2

Structura microbiocenozelor din organismul uman

Microbiocenoza	Microorganisme constituente
Bucală	Staphylococcus, Micrococcus, Streptococcus, Neisserii nepatogene, Lactobacillus, Veillonella, Fusobacterium, Spirochete aerobe şi anaerobe etc.
Faringiană	Streptococcus viridans, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus, Neisserii comensale, Fusobacterium, Spirochete etc.
Nazală	Corynebacterii comensale, Staphylococcus, Streptococcus, Neisserii comensale.
De tip colon	*La sugar alăptat la sîn :* Bifidobacterium, enterobacterii (E. coli), streptococi fecali, levuri etc. *La copilul alimentat mixt sau artificial, la toate vîrstele :* Bacteroides, Lactobacillus, Clostridium, enterobacterii (E. coli), streptococi fecali etc.
Cutanată	Staphylococcus epidermidis, Corynebacterii comensale, Moraxella etc.

Rolul bacteriilor comensale a fost definit, mai ales, pe baza informaţiilor obţinute pe animale axenice (germ-free) şi constă în contribuţia lor la dezvoltarea normală a intestinului şi a sistemului imun, la aprovizionarea organismului animal cu unele vitamine din complexul B şi vitamina K, la intervenţia lor metabolică (metabolizarea sărurilor biliare, colesterolului, amoniacului etc.). Ele constituie, de asemenea, o barieră de rezistenţă, împiedecînd popularea cavităţilor deschise cu microorganisme patogene. Importanţa lor este atestată şi de faptul că organismul uman este constituit din 10^{13} celule proprii şi 10^{14} celule de microorganisme.

2.1.2. INFECŢIA

Între relaţiile multiple dintre microorganisme şi organismul uman, între şi cele care realizează o stare modificată a acestuia din urmă — **infecţia**, de multe ori sub formă de boală infecţioasă.

Infecţia reprezintă totalitatea proceselor biologice care se desfăşoară în organism în cazul pătrunderii microorganismelor patogene, conflictul

Scanned with OKEN Scanner

dintre organismul parazit și organismul parazitat, cu tendința de a se produce o perturbare a homeostaziei. Infecția poate să fie manifestă clinic (boală infecțioasă), sau să nu fie însoțită de nici un semn aparent de perturbare funcțională — **forme fruste, forme inaparente.**

Un *caracter esențial al infecției,* îl reprezintă *specificitatea etiologică: un microorganism patogen determină o anumită boală infecțioasă.* Pentru ca un microorganism să poată fi considerat ca agent etiologic, trebuie aduse anumite dovezi; sînt necesare anumite condiții, cunoscute sub denumirea de **postulatele lui Koch:**

1. Microorganismul patogen trebuie să fie prezent în toate cazurile de boală.
2. El trebuie izolat și menținut în cultură pură.
3. Cultura pură izolată inoculată la animalele de laborator determină infecția caracteristică.
4. Trecerea prin infecție duce la instalarea imunității specifice.

Aceste postulate nu se folosesc ca reguli rigide, cu ele se operează interpretativ, cu tendința de a preciza determinismul statistic al etiologiei specifice a unei infecții. Foarte utile în conturarea, mai ales, a entităților clinico-monoetiologice, ele își păstrează valoarea și în structura actuală a morbidității infecțioase, în care predomină îmbolnăvirile prin sindroame plurietiologice. În ultima vreme, în stabilirea rolului etiologic al unui microorganism, au căpătat o semnificație majoră caracterizarea factorului/factorilor săi de patogenitate și, mai ales, mecanismele moleculare prin care aceștia își exercită efectele nocive.

În apariția infecției ca boală manifestă intervine o componentă care ține de reacția organismului parazitat față de agentul străin, prin care se conturează unele din **caracteristicile principale,** ale acestui proces.

1. **Evoluția stadială.** Boala infecțioasă evoluează în mai multe etape succesive:

a. *perioada de incubație:* intervalul de timp ce trece de la pătrunderea parazitului patogen în organism pînă la apariția primelor semne de suferință, variabil de la infecție la infecție, dar cu o durată caracteristică pentru o anumită infecție;

b. *perioada de debut,* în care apar primele semne ce atrag atenția asupra evoluției unui proces infecțios;

c. *perioada de stare,* în care se instalează tabloul clinic caracteristic pentru fiecare infecție;

d. *perioada de terminare:* rareori azi ca sfîrșit letal; în majoritatea infecțiilor, organismul uman neutralizează agresiunea parazitului și intră în *perioada de convalescență,* în care are loc refacerea alterărilor morfologice și funcționale produse în timpul infecției.

2. **Febra** este un semn comun al multor infecții: este semnul care de obicei atrage atenția asupra apariției unei infecții.

3. **Modificările sanguine** interesează caracteristic leucocitele, întîlnindu-se modificări în numărul și calitatea lor (leucocitoză, leucopenie, neutrofilie, eozinofilie etc.).

4. **Mecanismul de transmisie.** Pentru majoritatea infecțiilor microorganismele patogene trebuie să pătrundă în țesuturile gazdei și să se multiplice în ele. Această intrare în organismul gazdă se face pentru fiecare infecție într-o regiune precisă, constituind **poarta de intrare.**

De la poarta de pătrundere, soarta microorganismului este variabilă. În unele cazuri rămîne cantonat aici, dînd infecții localizate, de exemplu,

Scanned with OKEN Scanner

infecții piogene. Uneori agentul patogen se multiplică la poarta de intrare, elaborînd toxine care difuzează în întreg organismul și sînt răspunzătoare de alterările morfofuncționale caracteristice: toxiinfecții. Alteori de la poarta de intrare se produce o generalizare a infecției (septicemie), sau localizare caracteristică într-un organ sau țesut pentru care microorganismul are afinitate.

Indiferent care este difuziunea infecției în organismul gazdă, germenul se elimină din acesta pe o anumită cale — **cale de eliminare** — de multe ori identică cu poarta de intrare.

Pentru a ajunge de la un organism infectat, de la calea de eliminare a acestuia, la un organism susceptibil să facă infecția, cu poarta sa de intrare, microorganismul trece prin mediul extern, prin unii factori cum sînt: aerul, alimentele, apa, obiecte contaminate, mîini murdare, insecte vectoare etc. Toți acești factori de mediu constituie ceea ce se definește drept **căile de transmisie ale infecțiilor.**

Aceste trei elemente sînt reunite de către Gromașevski în noțiunea de *mecanism de transmisie a infecțiilor.*

Infecțiile care au un mecanism de transmisie comun au și unele trăsături clinico-epidemiologice, mai ales care țin de felul caracteristic de răspîndire al infecțiilor în colectivitate caracteristice. Pentru infecțiile cu mecanism de transmisie comun se aplică măsuri de combatere și prevenire asemănătoare. În mecanismul de transmisie factorul principal de caracterizare îl constituie poarta de pătrundere și aceasta reprezintă un criteriu de clasificare a infecțiilor: infecții conjunctivale, infecții respiratorii, infecții intestinale, infecții venerice, infecții tegumentare și transcutane, infecții sanguine.

2.1.3. PATOGENITATE ȘI VIRULENȚĂ

A. **Generalități.** Capacitatea unui microorganism de a produce infecție este denumită **patogenitate.** Ea reprezintă *o proprietate generală a unei specii.* În cadrul unei specii există populații (tulpini sau clone), care posedă această proprietate în grade diferite, de la cele la care ea este absentă, pînă la cele care sînt puternic patogene. Rezultă că, alături de alte caractere, și cele de patogenitate suferă fenomenul de variație, amplificat la multe specii datorită determinismului extracromozomial al unuia sau mai multor factori de patogenitate.

Gradul de patogenitate al unei populații se apreciază prin *virulență,* care constituie deci *o măsură a patogenității.* Virulența se exprimă în *DML* (doză minimă letală), care reprezintă numărul cel mai mic de microorganisme, sau cantitatea cea mai mică dintr-un produs microbian, care omoară toate animalele inoculate (mortalitate de 100%). Deoarece în această modalitate de testare există suficient de multe posibilități de eroare, se recurge la stabilirea DL_{50}, care reprezintă numărul de microorganisme, sau cantitatea de produs microbian care omoară 50% din animalele inoculate și care se determină prin calcul statistic (de exemplu, metoda Reed și Munch). Pentru a evita variațiile dependente de caracteristicile genetice ale animalelor se utilizează testarea pe linii pure (inbred) de animale.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru ca un microorganism să fie patogen și să producă infecție, trebuie să aibă proprietăți care să asigure: **1.** pătrunderea lui în țesuturile organismului gazdă și, în primul rînd, în cele de la poarta de intrare; 2. multiplicarea în țesuturi, dependentă, mai ales, de capacitatea de a rezista, anihila sau depăși factorii de apărare ai organismului gazdă; 3. producerea de alterări morfofuncționale și, în consecință, perturbări în homeostazie. Pentru aceasta microorganismul intervine prin anumite proprietăți mai mult sau mai puțin bine caracterizate, denumite **determinanți** sau **factori de patogenitate.** Rezultă din cele arătate anterior că, patogenitatea este de cele mai multe ori multifactorială și numai pentru puține infecții dependentă de un factor unic. Unii dintre determinanți au rolul de a favoriza pătrunderea în țesuturi și, mai ales, în mucoasele cavităților naturale, care reprezintă principalele porți de intrare; ei constituie categoria *factorilor de aderare* sau de *atașare* și sînt găsiți, mai ales la suprafața celulei. Deoarece sînt primii care intervin, de multe ori reprezintă și factori de *inițiere* ai infecției. Unii determinanți permit pătrunderea în țesuturi și tendința de generalizare a infecției: *invazie.* Mulți participă la *conturarea tabloului clinic* prin efectele de distrucție tisulară și perturbare funcțională ale organismului gazdă.

In producerea infecției factorii de patogenitate nu intervin separat ci între ei se stabilesc interrelații care asigură o acțiune comună, cooperantă. Pentru scopuri didactice este utilă însă o grupare a lor după proprietățile și mecanismele comune cu referire, în special, la infecția bacteriană, care este mai bine cunoscută din acest punct de vedere.

B. **Toxinogeneza** este proprietatea microorganismelor și, în primul rînd, a bacteriilor de a produce toxine: *exotoxine* și *endotoxine,* care se diferențiază prin proprietățile din tabelul 2.3.

Tabel 2.3

Proprietățile care diferențiază toxinele

Exotoxine	Endotoxine
Excretate de bacterii; se găsesc în concentrații mari în mediul în care acestea se multiplică.	Strîns legate de celula bacteriană; se obțin prin liza acesteia sau extracție chimică.
Polipeptide cu gr. mol. variabilă.	Complexe lipopolizaharidice. Lipidul A componenta toxică principală.
Termolabile; se inactivează la peste 60 °C.	Termostabile; rezistă și la 100 °C.
Puternic imunogene; duc la formare de anticorpi neutralizanți (antitoxine).	Nu induc formarea de anticorpi neutralizanți.
Se transformă prin tratare cu formol în anatoxine, utilizabile în vaccinuri.	Nu se transformă în anatoxine.
Foarte toxice (cantități de ng).	Slab toxice (sute de μg).
Producerea multor toxine este dependentă de conversia lizogenă.	Proprietate cromozomial dependentă.
Fiecare exotoxină activează specific (mecanisme farmacodinamice specifice).	Toate endotoxinele au mecanisme comune de acțiune (mecanisme farmacodinamice nespecifice).

1. **EXOTOXINELE** sînt întîlnite așa cum se vede din tabelul 2.4., atît la bacterii gramnegative, cît și la cele grampozitive. Cele mai caracteristice sînt cele de la bacteriile grampozitive: exotoxina difterică, tetanică, botulinică, stafilococică, streptococică etc. Majoritatea exotoxinelor induc

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.4

Bacterii producătoare de exotoxină

Grampozitive	Gramnegative
Corynebacterium diphteriae Clostridium tetani Clostridium botulinum Clostridiile gangrenei gazoase: C. perfringens, C. novyi, C. septicum etc. Bacillus anthracis Streptococcus pyogenes (grup A uman) Staphylococcus aureus	Yersinia pestis Shigella disenteriae shigae Bordetella pertussis Pseudomonas aeruginosa

formarea de anticorpi neutralizanți. Aceasta are importanță practică, în primul rînd, în aplicarea *seroterapiei*. Apoi, ele se transformă în anatoxine, pierd proprietatea toxică, dar păstrează pe cea imunogenă, inclusiv *inductoare de anticorpi* neutralizanți. De aceea, unele anatoxine sînt utilizate ca vaccinuri: anatoxina difterică, tetanică și stafilococică.

Multe din exotoxine sînt sintetizate de celulele bacteriene prin informația genetică adusă de bacteriofagi temperați (difterică, streptococică, toxine de la Clostridii) prin procesul de conversie lizogenă.

Unele exotoxine reprezintă factori unici sau principali de patogenitate (difterică, tetanică, botulinică); altele au o contribuție majoră la conturarea tabloului clinic, în general prin mecanisme specifice, din care unele bine caracterizate.

Exotoxinele de la b. difteric, b. piocianic, b. tetanic și b. botulinic au fost obținute în stare înalt purificată și s-a văzut că molecula poate fi, în condiții naturale și experimentale, fragmentată. Fragmentele notate B servesc la atașarea moleculei pe receptorii din membrana citoplasmatică a celulei sensibile și participă împreună cu aceștia la pătrunderea

Tabel 2.5

Proprietăți ale unor exotoxine și enterotoxine

Toxina	Gr. mol.	Greut. subunit.	Cofactor	Mecanism de acțiune	Receptor
Difterică	61.000	A 21.000 B 40.000	NAD	Ribozilarea EF_2 dependentă de NAD	?
Pseudomonas aeruginosa	66.000	A 27.000 B 40.000	NAD	idem	?
Tetanică	160.000	A 53.000 B 107.000		Blochează inhibiția sinaptică în SNC	GD_{1b}* G G Gu S SL C L C**
Enterotoxina holerică	85.000	A 21.500 A 5.000 B5 × 11.600	NAD	Ribozilarea dependentă de NAD a unei proteine și activitatea adenilatciclazei	GM_1* G Gu S L C**

* GD_{1b} și GM_1 = gangliozide receptori.
** G: glucoză, Gu: glucozamină, S: acid sialic, L: lactoză, C: ceramidă

Scanned with OKEN Scanner

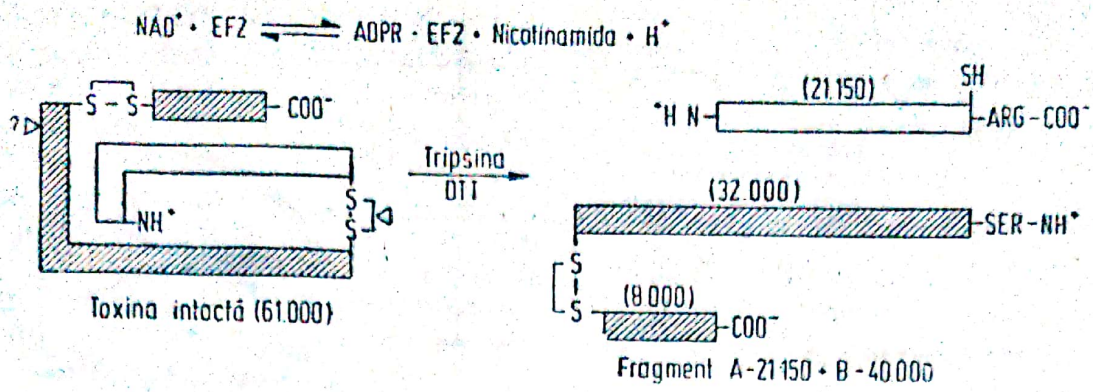


Fig. 2.1. Prezentarea schematică a moleculei toxinei difterice și a fragmentelor rezultate din scindarea ei.

toxinei în celulă. Unii receptori au fost bine caracterizați, cum sînt gangliozidele receptori pentru toxina tetanică și botulinică (GD_{1b}). Fragmentele A, în general de greutate moleculară mai mică, se desfac din moleculă după pătrunderea în celulă, au funcție enzimatică prin care se realizează efectul toxic (tabel 2.5.). Pe aceste baze pot fi rezumate mecanismele specifice ale principalelor exotoxine.

Toxina difterică inoculată subcutanat la cobai determină o boală experimentală cu semne caracteristice: edem gelatinos la locul de inoculare, revărsate în seroase (pleură, peritoneu), hipertrofia și hiperemia glandelor suprarenale. Ea este cea care la om determină toate procesele patologice din difterie. Efectul toxinei se explică prin necroza celulară rezultată din blocarea sintezei proteice prin mecanismul următor (fig. 2.1.). Toxina cu greutatea moleculară de 61.000 se fixează pe receptorii existenți pe celulele sensibile (practic toate celulele organismului uman sînt sensibile) prin fragmentul B (gr. mol. 40.500) și promovează pătrunderea moleculei în celulă. Urmează scindarea moleculei prin desfacerea unei legături S—S și eliberarea fragmentului A (gr. mol. 21.000). Acesta are activitate de ADP-ribozil-transferază, transferînd jumătatea ADP-riboză din NAD, proces cunoscut ca ribozilare, pe factorul de elongare EF_2, inactivîndu-l. Se blochează astfel treapta de translocare din sinteza proteică și deci stoparea acesteia și, în consecință, necroza celulară.

Toxina b. piocianic are un mecanism identic și constituie o situație paradoxală: două bacterii îndepărtate ca poziție taxonomică și patogenitate au aceeași acțiune.

Toxina tetanică, fixîndu-se pe gangliozide din neuroni, duce la inactivarea sinapsei inhibitorii din S.N.C.

Toxina botulinică scade sinteza și eliberarea acetil-colinei în toate segmentele sistemului nervos periferic care sînt colinergice.

Toxina produsă de b. perfringens are activitate de lecitinază și reduce activitatea succinoxidazei prin hidroliza lecitinei din membrana mitocondrială, sau hemoliză, dacă acționează asupra membranei hematiilor.

Toxina b. pestei inhibă respirația mitocondrială în mușchi.

ENTEROTOXINELE formează un grup particular de exotoxine, fiind un factor principal de declanșare a *sindromului diareic* ce se întîlnește în toxiinfecții alimentare, holeră și enterită. Toate enterotoxinele sînt proteice și declanșează formarea de anticorpi neutralizanți.

Scanned with OKEN Scanner

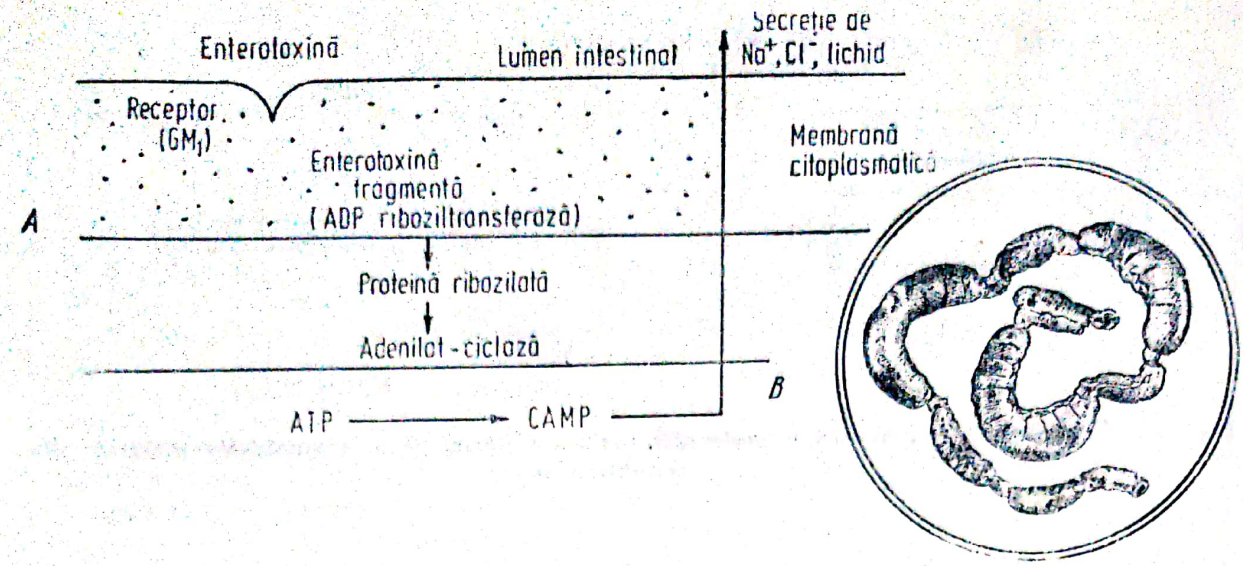


Fig. 2.2. Mecanismul de acțiune al enterotoxinei, avînd ca rezultat secreția de apă și electroliți (*A*) și modelul ansei ligaturate (*B*).

Cele mai multe informații privind mecanismele de acțiune ale enterotoxinelor au fost furnizate de **toxina de la** *Vibrio cholerae*. Structura ei moleculară este asemănătoare cu a altor exotoxine, cu particularitatea că fragmentul B este polimeric (format din 5 polipeptide cu gr. mol. 11.600). Prin acesta toxina se atașează de receptori (gangliozidul GM_1) de pe membrana citoplasmatică a celulelor sensibile, în principal, celulele epiteliale ale intestinului subțire. După atașarea de receptorii celulari se eliberează fragmentul A, care are funcție de ADP-ribozil-transferază. Rezultă ribozilarea unei proteine, care activează adenilat-ciclaza și are loc creșterea nivelului celular al AMP_c (fig. 2.2.). Cunoscut fiind rolul nucleotidului în reglarea metabolismului hidromineral, are loc în consecință o comutare a celulei epiteliale intestinale, dintr-o celulă cu rol major în absorbție, într-o celulă secretoare de apă și electroliți. Eliminarea acestora în intestinul subțire declanșează sindromul diareic holeriform. Acesta este deci cauzat de o *leziune biochimică* în epiteliul intestinului subțire.

În mod similar este structurată molecular și are același mecanism de acțiune și **enterotoxina termolabilă de la** *E. coli;* ea are un determinism plasmidic (plasmida Ent.). Plasmida Ent poate fi transferată prin conjugare, iar prin clonarea ei moleculară s-a văzut că determinanții genetici ai producerii enterotoxinelor au proprietăți de transpozoni.

Enterotoxinele pot fi evidențiate experimental prin testul ansei jejunale ligaturate la iepuri sau prin testare pe linii celulare speciale (linia Y de suprarenale, linia obținută din ovar de hamster ș.a.). Prin folosirea acestor teste, producerea de enterotoxine s-a găsit la mai multe specii bacteriene, mai ales din *Enterobacteriaceae,* la care este posibil transferul plasmidei Ent prin conjugare. La acestea se adaugă prezența enterotoxinelor la *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus* și *Clostridium perfringens de tip A* (tabel 2.6.).

Probabil că nu toate enterotoxinele declanșează sindromul diareic prin mecanismul descris anterior. În acest sens este precizat că enterotoxinele stafilococice, ajunse în intestin prin alimente, stimulează receptorii nervoși, iar transmiterea impulsurilor la centri nervoși din S.N.C. ai motilității intestinale determină vărsăturile caracteristice.

Scanned with OKEN Scanner

2. **ENDOTOXINELE** au fost izolate prima oară de A. Boivin și L. Mesrobeanu de la Institutul Cantacuzino. Ele au proprietăți diferite de exotoxine (v. tabelul 2.3). Sînt identice cu antigenul O structurat în suprafața peretelui celular (membrana externă) și de aceea se găsesc numai la *bacteriile gramnegative*. Ele sînt complexe moleculare cu trei componente importante: lipidică, polizaharidică și proteică. Efectele toxice se datoresc în principal lipidului A din componenta lipidică, ceea ce explică faptul că nu se induce formarea de anticorpi neutralizanți.

Tabel 2.6

Bacterii producătoare de enterotoxină

Vibrio cholerae
Escherichia coli
Klebsiella
Enterobacter aerogenes
Citrobacter freundi
Proteus
Yersinia enterocolitica
Salmonella (?)
Pseudomonas aeruginosa
Aeromonas hydrophila
Bacillus cereus
Clostridium perfringens tip A
Staphylococcus aureus

Indiferent de bacteriile de la care provin, patogene sau nepatogene, endotoxinele determină aceleași efecte biologice. Administrate în doze mici declanșează în organismul animal la care au fost inoculate: febră, tulburări circulatorii, vasodilatație periferică, creșterea permeabilității vasculare, încetinirea circulației venoase de reîntoarcere, stagnarea în microcirculație, edem și hemoragii punctiforme în viscere. Se instalează hipotensiune și leucopenie. Administrarea în doze mici repetate duce la mărirea toleranței față de endotoxină și la o creștere a rezistenței nespecifice față de infecție. În aceste condiții, apare în ser un factor care are proprietate necrozantă asupra tumorilor. De asemenea endotoxina poate determina avort, prin accelerarea transportului produsului de concepție. Ea are și o intervenție imunoreglatoare, în raport de condițiile experimentale, avînd efect de amplificare sau de supresie a răspunsului imun. Prin administrare de doze mari se instalează șocul endotoxic, cu colaps periferic, ce poate duce la șoc mortal.

Între efectele biologice ale endotoxinei, un loc important îl are activarea complementului pe cale alternativă și relația ei cu sistemul de coagulare, prin care se explică apariția fenomenului de coagulare intravasculară diseminată. Endotoxina activează factorul XII (Hageman) și se inițiază cascada sistemului intrinsec de coagulare, cu transformarea fibrinogenului în fibrină ca și aglutinarea trombocitelor pe endoteliul vascular, ajungîndu-se la leziuni necrotice și hemoragice în diferite viscere.

Multe din procesele arătate anterior, pînă la cele de șoc, apar în infecțiile cu bacterii gramnegative și contribuie la conturarea tabloului clinic.

În ultima vreme s-au acumulat date care conturează o nouă concepție privind mecanismul de acțiune al endotoxinei. Complexitatea de fenomene biologice nu este determinată de acțiunea directă a toxinei, ci mai degrabă prin substanțe solubile biologic active, deci de mediatori (peste 30), eliberați de celula țintă, asupra cărora se exercită acțiunea primară. Unii dintre aceștia pot fi produși de limfocite, fibroblaste sau celule endoteliale. Macrofagele (S.M.F.) însă îi pot elibera pe toți. La aceasta se adaugă observațiile făcute pe o linie de șoarece, C_3HeJ, care este rezistentă sau slab reactivă la multe din efectele endotoxinei, fenomen care se datorește genetic unui singur locus, localizat probabil pe cromozomul 4. S-a dovedit

Scanned with OKEN Scanner

experimental că această reactivitate modificată se datorește, în primul rînd, *macrofagului*. S-a definit astfel că celula principală, care elaborează mediatorii (din categoria monochinelor) ce declanșează efectele biologice ale endotoxinei, este *macrofagul*.

C. **Determinanți de patogenitate de suprafață celulară.** Cei mai mulți dintre acești determinanți, dacă sînt izolați din celulă și purificați, nu au efecte toxice evidente. Prezența lor pe suprafața celulară conferă microorganismului care-i posedă proprietăți variate (tabel 2.7.). O parte din ei joacă rol în inițierea infecției, prin mecanisme diferite. Așa cum s-a văzut mucoasele cavităților deschise reprezintă principalele porți de intrare. De aceea o intervenție importantă a acestor factori, care reprezintă de multe ori antigene de suprafață, constă în stabilirea lor pe celulele epiteliale ale mucoaselor prin atașarea lor pe receptori existenți pe acestea: proteina M piliară la streptococul uman de grup A, pilii K_{88}, K_{99}, F.C.A., de la *E. coli* etc. Efectul principal al acestor factori constă în protejarea bacteriilor și a altor microorganisme față de mecanismele de apărare ale gazdei. Poate fi interferată funcția fagocitară prin împiedicarea endocitozei (polizaharizii capsulari, pilii de la gonococ), sau a fazei de digerare (sulfolipidul de la b. tuberculos). Prin situarea la suprafața celulei bacteriene,

Tabel 2.7

Determinanții de patogenitate din suprafața bacteriană

Structura de suprafață (natura chimică)	Efectul
1. Polizaharide capsulare: pneumococ, Klebsiella, Haemophylus, meningococ Polipeptid capsular: B. anthracis	Antifagocitar, favorizînd invazia în țesuturi.
2. Proteina R (din pili) la steptococul uman grup A	Aderare de mucoasă faringiană, antifagocitar.
3. Mucopeptidul din perete la stafilococ	Activitate antiinflamatoare.
4. Pilii de la gonococ	Aderare de celule epiteliale ale organelor genitale și împiedicarea endocitozei.
5. Pilii de la E. coli (K_{88}, K_{99}, FCA)	Aderare de epiteliul intestinului subțire.
6. Antigenul Vi (Salmonella typhi)	Antifagocitar, favorizează invazia.
7. Antigene de perete la Shigella	Penetrare și multiplicare în epiteliul intestinului gros.
8. Sulfolipide anionice la b. tuberculozei	Împiedică formarea fagolizozomilor în macrofag.
9. Cord factor la b. tuberculozei	Inhibă migrarea macrofagelor.
10. Siderofori	Anihilează rezistența nutrițională.

protejează protoplastul de efectele nocive ale activării complementului în urma fixării lui pe complexele antigen-anticorp, formate pe straturile de suprafață. Mucopeptidul de la stafilococ inhibă procesul inflamator, opunîndu-se eliberării de kinine, iar cord factorul b. tuberculos, pe lîngă efectele sale toxice, inhibă migrarea macrofagului. În unele cazuri proprietatea antifagocitară are rezultate multiple: permite stabilirea la poarta de intrare, promovează invazia și multiplicarea abundentă în țesuturi (polizaharidele capsulare). Unele antigene, cum sînt cele de la *Shigella flexneri* și *E. coli* tulpini invadante, permit pătrunderea și multiplicarea bacteriană în celula epitelială. O situație particulară o ocupă *sideroforii* — substanțe care se găsesc la suprafața celulei, sau pot fi eliberați în

Scanned with OKEN Scanner

mediu şi, prin complexarea fierului, favorizează transportul acestuia în celula bacteriană. În felul acesta, anihilează aşa-numita **rezistenţă nutriţională.** Majoritatea antigenelor de suprafaţă favorizează instalarea pe mucoase şi prin anularea barierei reprezentată de microbiocenoze, prin mecanisme încă puţin cunoscute.

D. **Produşi extracelulari netoxici** sînt substanţe eliberate la bacterii cu activitate enzimatică, sau precursori şi activatori de enzime (tabelul 2.8.). Multe bacterii (stafilococ, streptococ, b. perfringens ş.a.) eliberează un număr mare de asemenea substanţe. Mulţi din aceşti factori au rol de invazine, favorizînd difuzarea în ţesuturi a infecţiei, sau generalizarea ei (hialuronidaza, colagenaza, fibrinolizinele etc.), anihilînd prin acţiunea lor funcţia de bariere, de localizare a infecţiei pe care o au ţesutul conjunctiv, colagenul sau reţeaua de fibrină din procesul inflamator. Altele

Tabel 2.8

Produşi extracelulari netoxici (enzime, precursori sau inactivatori de enzime)

Produsul	Acţiune şi efect
Hialuronidaza (streptococ, stafilococ, pneumococ, clostridii).	Hidroliza acidului hialuronic din ţesutul conjunctiv; invazie şi generalizarea infecţiei.
Colagenaza (Cl. perfingens, Cl. hystoliticum).	Degradarea colagenului; invazie şi generalizarea infecţiei.
Hemolizinele (stafilococ, streptococ, Cl. perfringens).	Citolitic; aprovizionare cu fier.
Fibrinolizina (streptococ, stafilococ).	Activare plasminogen → plasmină; degradarea coagulului de fibrină; formare de microcoagul; favorizează invazia bacteriană.
Leucocidine (streptococ, stafilococ).	Împiedică degradarea intraleucocitară şi invazia.
Coagulaza (stafilococ).	Coagularea plasmei; protejarea bacteriilor de factorii antibacterieni.
Proteaze (Streptococcus sanguis, unele Neisserii).	Degradează IgA secretorii; protejează bacteriile de opsonizare şi fagocitoză.
Catalaza, peroxidaza, superoxidismutaza.	Protejează de efectul bactericid al apei oxigenate şi radicalilor de oxigen din fagocite; favorizează invazia.

contribuie la invazia prin interacţiune cu factorii de apărare ai gazdei: leucocidine, catalază, peroxidază, împiedicînd distrugerea intrafagocitară a microorganismelor. Coagulaza de la stafilococ şi b. pestei promovează formarea unei reţele dense de fibrină, care izolează procesul inflamator rezultat din infecţie şi protejează microorganismele de acţiunea factorilor de apărare (anticorpi, complement) şi chiar de efectul antibioticelor. Hemolizinele au efecte citolitice, putîndu-se astfel explica anemia care însoţeşte unele infecţii şi constituie în acelaşi timp o modalitate de aprovizionare cu fier.

În general, aceşti determinanţi au o contribuţie majoră, de obicei în acţiune sinergică cu alţi factori de patogenitate, la conturarea tabloului clinic.

Aşa cum s-a afirmat de la început, există o acţiune comună în cele mai multe infecţii, a unui număr mai mic sau mai mare de factori de patogenitate. Să utilizăm un singur exemplu: E. coli poate determina

Scanned with OKEN Scanner

sindromul diareic prin acțiunea enterotoxinei. Deoarece aceasta își exercită efectul asupra mucoasei intestinului subțire, este necesar ca să populeze intestinul subțire. Aceasta se realizează prin intervenția pililor, care, prin atașare de mucoasa acestuia, permit fixarea și multiplicarea bacteriilor la acest nivel.

2.2. REZISTENȚA NATURALĂ

Apărarea antiinfecțioasă se realizează prin cooperarea a două categorii de mecanisme biologice complexe: *rezistența naturală* și *imunitatea dobîndită*. Însumarea efectelor celor două categorii de procese conturează starea de rezistență sau susceptibilitate față de o infecție.

Rezistența naturală este constituită din acțiunea unor factori anatomici, metabolici, celulari, serici, cu acțiune *nespecifică,* față de oricare agent infecțios. Rezistența naturală este înăscută și genetic determinată. Factorii genetici imprimă rezistenței naturale caracterul de specie. Astfel, există infecții prezente numai la om *(antroponoze):* gonoree, sifilis, febră tifoidă, scarlatină etc. Alte infecții numite *zoonoze* sînt prezente numai la animale; unele dintre acestea, etichetate ca *antropozoonoze,* pot trece și la om: bruceloza, febra Q, rabia, infecția cărbunoasă etc. Factorii genetici sînt răspunzători și de diferențele individuale ale rezistenței naturale, în cadrul speciei. Spre exemplu, în cadrul aceleiași specii animale se pot obține linii de animale foarte sensibile și linii foarte rezistente la o anumită infecție (tuberculoză, salmoneloze etc.). Diferențe individuale în rezistența naturală se observă și la om.

2.2.1. FACTORII CARE ASIGURĂ REZISTENȚA NATURALĂ

Factorii care asigură rezistența naturală pot fi grupați astfel:

1. **Barierele anatomice,** reprezentate de piele și mucoase, constituie prin integritatea lor anatomo-structurală bariere mecanice, iar prin secrețiile elaborate au rol de bariere chimice, împiedicînd pătrunderea agenților infecțioși în organism. În tabelul 2.9. sînt grupate aceste bariere și modul lor de acțiune.

Prin funcțiile arătate, barierele anatomice împiedică popularea organismului cu alte bacterii decît cele întîlnite în mod obișnuit în microbiocenoze. Rolul de barieră mecanică a tegumentelor prezintă importanță deosebită, puține bacterii putînd străbate pielea intactă: leptospire, brucelle, bacil tularemic. Acest rol reiese și din observația că distrugerea integrității structurale prin plăgi, arsuri etc., se complică deseori cu infecții bacteriene.

2. **Factorii umorali:** este bine cunoscut efectul bactericid al sîngelui, care rezultă din acțiunea antimicrobiană a unor proteine pe care le conține (tabel 2.10.).

Componentelor descrise în tabel li se asociază factorii tisulari și celulari ajunși în umori, precum și „anticorpii naturali", care sînt imunglo-

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.9

Barierele anatomice

Tip	Mod de acțiune
Tegumente	— Barieră mecanică — *p*H-ul scăzut (3—5) și acizii grași nesaturați din secrețiile sebacee au efect bactericid.
Mucoasă respiratorie	— Barieră mecanică — Mucusul respirator înglobează microorganisme care prin mișcarea cililor epiteliali sînt eliminate spre exterior — Lizozimul prezent în mucus are efect bactericid asupra unor bacterii grampozitive — Inhibitorii nespecifici ai virusurilor împiedică atașarea acestora pe celule
Mucoasă conjunctivală	— Spălare mecanică prin lacrimi — Lizozim prezent în cantitate mare cu efect bactericid (bacterii grampozitive)
Mucoasă digestivă	— Aciditatea gastrică (*p*H = 2) are rol bactericid — Peristaltismul intestinal elimină mecanic microorganismele — Enzimele pancreatice, bila au efect antimicrobian față de unele microorganisme
Mucoasă urogenitală	— Acțiune mecanică de spălare a jetului urinar (staza urinară favorizează instalarea infecției) — *p*H-ul acid în căile genitale la femei împiedecă popularea cu bacterii patogene — Spermina din lichidul seminal are efect bactericid

Tabel 2.10

Factorii umorali

Tip	Mod de acțiune	Observații
Beta-lizine	— Bactericid asupra unor bacterii grampozitive (Bacillus, Staphylococcus)	Eliberate din plachete
Sistemul complement	— Rol opsonizant — Mediator al inflamației — Amplifică răspunsul imun	Funcțiile se manifestă după „activare"
Sistemul properdinic	— Rol bactericid — Activarea complementului — Promovarea fagocitozei — Bactericid pentru unele bacterii grampozitive	

buline serice ce apar în lipsa unui stimul antigenic specific și sînt consecința înrudirilor antigenice frecvent întîlnite în lumea vie, mai ales între microorganisme. Stimulul antigenic implicat mai frecvent în formarea acestor anticorpi îl constituie microorganismele din microbiocenoze.

3. **Factorii tisulari și celulari** sînt reprezentați de polipeptide bazice de tipul protaminei și histonei, unii acizi grași prezenți în diferite țesuturi și celule, ei exercită efecte antibacteriene. Fagocitele conțin în lizozomi enzime și alte proteine cu efect bactericid.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre factorii celulari prezintă importanță deosebită interferonii, cu acțiune antivirală, sintetizați de diverse celule.

4. **Microbiocenozele:** populațiile bacteriene prezente în mod normal în organism împiedică stabilirea bacteriilor patogene, acționînd prin mecanisme diferite: competiție pentru substanțe nutritive, elaborare de produși toxici, elaborare de colicine etc.

5. **Febra,** prezentă în majoritatea infecțiilor, limitează multiplicarea unor microorganisme ca: treponeme, gonococi, virusuri, de aceea este privită ca un mecanism nespecific de apărare.

6. **Fagocitoza și inflamația** sînt mecanisme majore de eliminare a bacteriilor din organism. Eficiența acestor mecanisme este amplificată de imunitatea dobîndită.

2.2.2. FAGOCITOZA

Constituie o verigă principală a mecanismelor de rezistență naturală. Descrisă de Mecinikov la sfîrșitul secolului trecut, a fost recent încadrată de către De Düve, între procesele de endocitoză. Fagocitoza este definită ca proprietatea unor celule de a înghloba și digera particule străine (cuvîntul grecesc *fagein* = a mînca); înglobarea de macromolecule este numită pinocitoză *(pinein* = a bea).

Deoarece endocitoza este dezbătută pe larg în cursul de Fiziologie și Biologie celulară, în capitolul prezent se subliniază numai aspectele legate de funcția de apărare antiinfecțioasă a fagocitozei.

Celulele care au proprietatea de a fagocita sînt:

a. *polimorfonuclearele (PMN) sanguine,* îndeosebi, neutrofilele. Eozinofilele fagocitează numai complexe antigen-anticorp, intervenind în reacțiile de hipersensibilitate de tip imediat;

b. *sistemul fagocitar mononuclear (SFM),* care cuprinde celule mononucleare cu capacitate de a fagocita, comportîndu-se ca fagocite „profesioniste", similar PMN. Prezența pe suprafața lor a receptorilor, pentru fracțiunea C_3 a complementului și pentru fragmentul Fc al imunoglobulinelor, mărește capacitatea de fagocitare. Sistemul fagocitar mononuclear diferă astfel de alte celule ale SRE.: celule reticulare, endoteliale, fibrocite, care au randament redus în endocitoză, nu au receptori pentru C_3 și Fc, comportîndu-se doar ca celule „amatoare" de fagocitoză. SFM include monocitul sanguin circulant și macrofagele tisulare (fig. 2.3.), celule larg distribuite în organism, cu importanță deosebită în apărarea antiinfecțioasă.

Unele proprietăți și funcții care caracterizează fagocitele sînt redate în tabelul 2.11.

Funcțiile SFM sînt dezvoltate în tabelul 2.12. Reiese deci că SFM îndeplinește funcții multiple în apărarea antiinfecțioasă, acționînd ca factor de rezistență naturală pe de o parte, iar pe de altă parte intervenind în răspunsul imun, inclusiv cu funcții de reglare a imunității.

Etapele fagocitozei. Procesul de fagocitoză se desfășoară în mai multe etape:

Scanned with OKEN Scanner

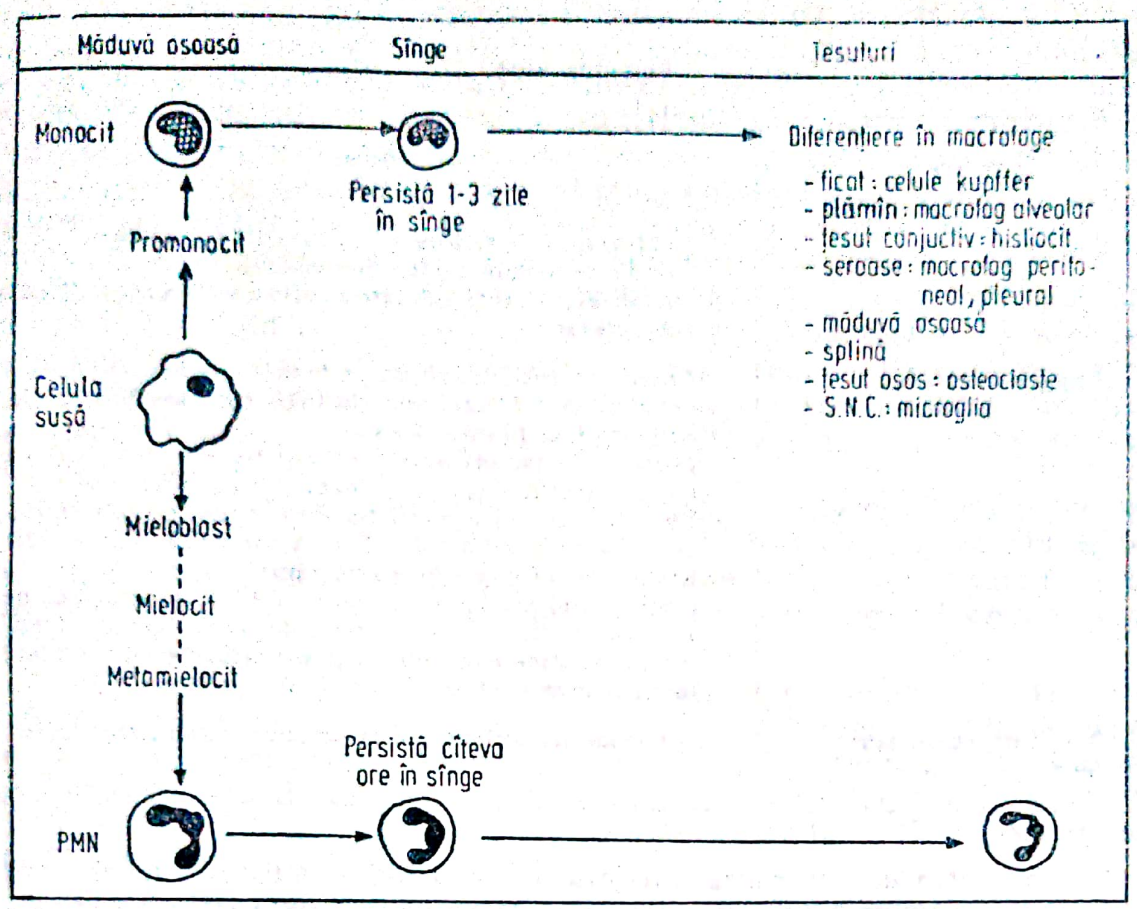


Fig. 2.3. **Celule fagocitare.**

Tabel 2.11

Caractere ale fagocitelor PMN și SFM

POLIMORFONUCLEARE		SISTEM FAGOCITAR MONONUCLEAR	
Proprietăți	**Funcții**	**Proprietăți**	**Funcții**
— Au origine medulară	Sînt foarte mobile	— Origine medulară	Fagocitoză
— Sînt celule cu viață scurtă	Sînt primele care se deplasează la locul infecției	— Sînt celule cu viață lungă	Funcție secretorie
— Au pe suprafață receptori pentru C_3 și Fc a IgG	Reprezintă prima linie de celule care fagocitează	— Au pe suprafață receptori pentru C_3 și Fc a IgG	Celule asociate răspunsului imun
— Au un număr mare de lizozomi	Digeră total bacteriile fagocitate	— Au un număr mic de lizozomi (numărul crește în macrofagul „activat")	
— Mieloperoxidaza prezentă în lizozomi	Eozinofilele înglobează complexe antigen-anticorp	— Nu au mieloperoxidază	
— Sînt active neutrofilele, apoi eozinofilele		— Cuprinde monocitul sanguin și macrofagele tisulare. Macrofagele diferă morfologic între ele, dar funcționează identic	

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.12

Funcţiile SFM

Funcţie	Exprimare
1. Fagocitoză	— Reprezintă a doua linie de celule care fagocitează — Nu digeră complet microorganismele — Înglobează resturi celulare şi tisulare, „curăţind" teritoriul lezat
2. Funcţie secretorie	— Enzime cu acţiune asupra proteinelor prezente în mediul extracelular: colagenaze, elastaze, proteaze lizozomale, activatori ai plasminogenului — Secreţie de factori antiinfecţioşi: lizozim, fracţiuni ale complementului (C_2C_4, probabil C_3C_5), interferon — Factori ce modelează funcţia altor celule: proteină mitogenă asupra limfocitului T şi a timocitului — Citotoxine asupra celulelor străine şi tumorale — Reglatori ai activităţii celulare: CAMP, prostaglandine — Factori de diferenţiere: factorul de „stimulare al coloniilor", care stimulează diferenţierea celulei suşă medulare în linia granulocitară
3. Cooperare cu sistemul imun	— Intervine în declanşarea şi reglarea răspunsului imun

1. *Chemotaxia:* migrarea dirijată a fagocitelor sub influenţa unor stimuli care realizează un gradient de concentraţie; fagocitele se vor deplasa spre locul unde stimulii se află în concentraţie maximă. Factorii chemotactici pot fi de origine bacteriană, sau componente ale organismului gazdă (tabel nr. 2.13).

Tabel 2.13

Factori chemotactici

Componente bacteriene	Componente ale organismului
Proteine bacteriene, îndeosebi N-formil-metionil-peptide. Unele lipide bacteriene.	— Componente din sistemul complement: C_{5a}, C_{567}, obţinute prin activare. — Proteine serice: kallikreina, fragmente de fibrină. — Histamina. — Derivaţi arachidonici. — Produse ale limfocitelor (limfokine). — Unii factori eliberaţi de neutrofile.

Fracţiunea C_{5a} constituie cel mai activ şi mai bine cunoscut factor chemotactic al gazdei. Fagocitele au receptori separaţi pentru fiecare factor chemotactic. Aceşti factori acţionează determinînd modificări biochimice la nivelul membranei citoplasmatice a fagocitelor şi creşterea c-GMP (fără a afecta cAMP), menţinînd un echilibru între cele două nucleotide ciclice, necesar pentru realizarea mişcării. În migrarea spre locul infecţiei un rol important revine şi microfilamentelor de actină şi miozină, cu proprietăţi contractile.

Scanned with OKEN Scanner

2. *Recunoaşterea şi ataşarea* sînt dependente de proprietăţile de suprafaţă ale bacteriilor şi fagocitelor. Majoritatea bacteriilor patogene trebuie acoperite cu anticorpi şi/sau complement pentru a fi fagocitate. Acest proces de modificare a suprafeţei bacteriene în vederea fagocitozei se numeşte „opsonizare" (de la gr. *opsonein* = a pregăti pentru mîncare). Ca opsonine acţionează în primul rînd imunglobulinele IgG_1 şi IgG_3, active în absenţa complementului. Receptorii pentru fragmentul Fc al imunglobulinelor, de pe suprafaţa fagocitelor, acţionează ca liganzi, ataşînd bacteriile opsonizate pe fagocite, favorizînd înglobarea. Alţi anticorpi din clasele IgG şi IgM pot fi opsonizanţi numai prin capacitatea de a activa complementul, cu eliberarea componentei C_{3b}, care se fixează pe suprafaţa bacteriei. Receptorii C_3 de pe fagocite vor favoriza ataşarea bacteriei. Se adaugă intervenţia unei opsonine nespecifice, prezentă în ser şi care face parte din alfa-2-globuline.

Unele componente bacteriene de suprafaţă (de exemplu, lipopolizaharidul bacteriilor gramnegative şi acizii teichoici, sau peptidoglicanul unor bacterii grampozitive) pot determina legarea şi clivarea C_3 pe cale alternativă, în absenţa anticorpilor. În acest caz opsonizarea se realizează numai prin C_3.

3. *Înglobarea:* fagocitele emit pseudopode, care înconjoară particula şi fuzionează, formînd o vacuolă fagocitară sau fagozom. Energia necesară acestui proces derivă din glicoliza anaerobă. Creşterea glicolizei anaerobe este însoţită de formare de acid lactic şi de scăderea *p*H-ului. Totodată se constată intensificarea sintezei de fosfolipide (formare de noi unităţi de membrană).

4. *Omorîrea şi digerarea microorganismelor:* conţinutul lizozomal se varsă în fagozomi în urma fuzionării membranei lizozomale cu cea a fagozomilor (proces de „degranulare" a fagocitelor). Mecanismul prin care factorii lizozomali omoară bacteriile nu este complet elucidat, dar sînt implicate:

a. *mecanisme oxidative:* după ingerarea microorganismelor se observă o creştere a consumului de oxigen şi oxidarea glucozei prin şuntul hexozo-monofosfat, conducînd la formarea şi eliberarea O_2^- şi H_2O_2. Evenimentele care au loc sînt redate în figura 2.4.

După cum reiese, o oxidază, probabil legată de membrana citoplasmatică, utilizînd piridinnucleotide ca donatori de electroni, este activată (1), formîndu-se O_2^- şi H_2O_2 cu acţiune bactericidă (2). H_2O_2 serveşte ca substrat pentru mieloperoxidază (MPO) (3), care pătrunde în fagozomi prin degranulare şi promovează reacţiile de halogenare. O_2^- care părăseşte fagozomul suportă o dismutaţie rapidă spre H_2O_2 (4), catalizată de superoxid-dismutază. H_2O_2 în citosol poate fi catabolizată de catalază (5), sau de glutation peroxidază (6), care leagă catabolismul H_2O_2 de şuntul pentozic.

În mecanismul omorîrii oxidative par a avea rol O_2^-, H_2O_2 şi radicalul OH^-, ca şi acidul hipocloros generat de MPO. Ţinta mecanismelor oxidative ar putea fi reprezentată de lipidele nesaturate membranare şi din învelişul extern, de peptide, nucleotide piridinice, grupe sulfhidril, enzime hem, acizi nucleici;

b. *mecanisme neoxidative:* polipeptidele bazice, lizozimul, proteazele lizozomale, lactoferina şi *p*H-ul acid, exercită acţiune bactericidă.

Unele bacterii, deşi înglobate în fagocite, nu pot fi digerate putînd persista timp îndelungat, sau chiar se multiplică în macrofage, ducînd la

Scanned with OKEN Scanner

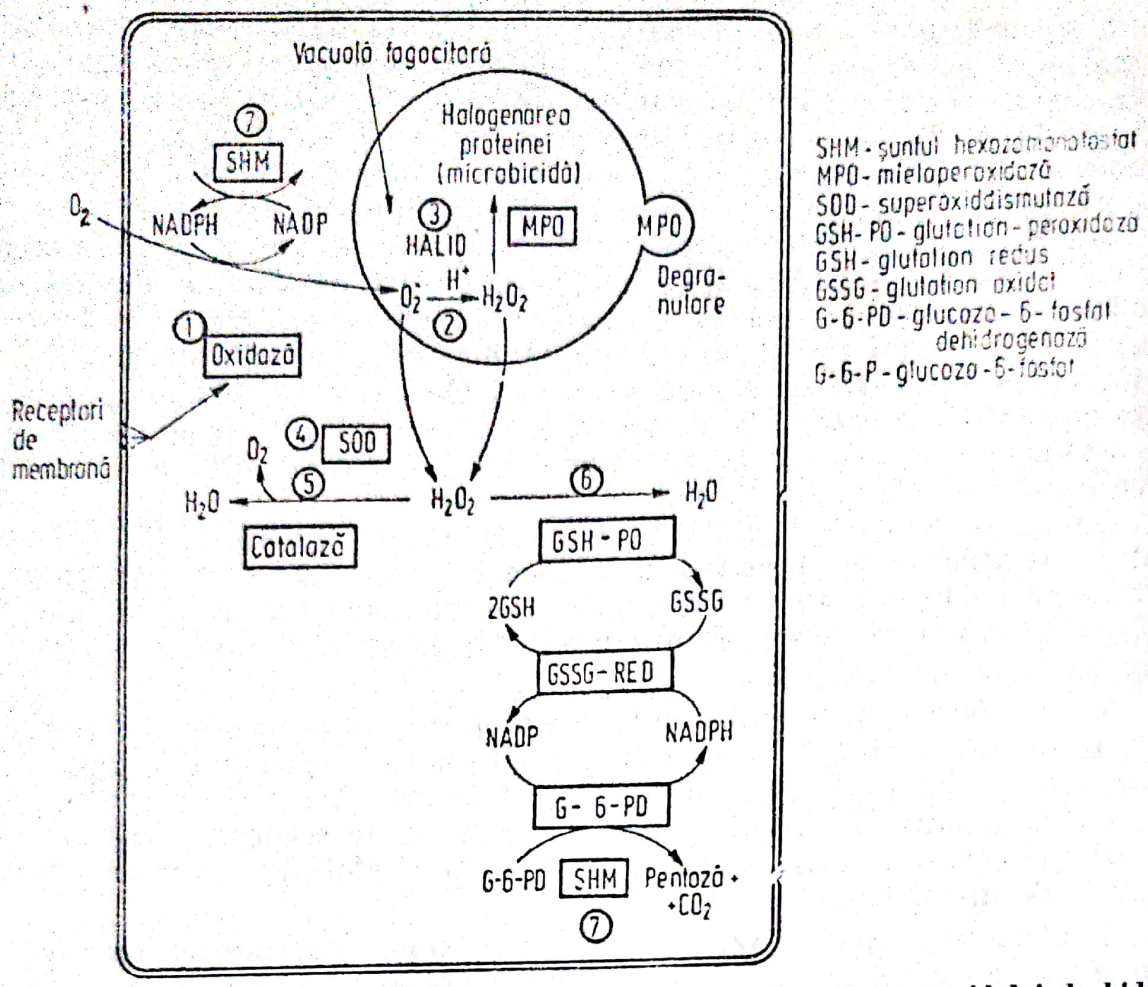


Fig. 2.4. Procesele care duc la formarea radicalilor activi de oxigen şi a peroxidului de hidrogen ce contribuie la efectul bactericid al PMN.

infecţii cronice. Poziţia lor intracelulară le scuteşte de acţiunea antibioticelor sau a mecanismelor imune. Împotriva acestor microorganisme intracelulare intervine macrofagul „activat" prin limfokinele eliberate de limfocitul T şi care are o capacitate crescută de înglobare şi omorîre a bacteriilor.

2.2.3. INFLAMAŢIA

Rezultă dintr-o succesiune de reacţii vasculare, umorale, celulare, care apar ca răspuns la acţiunea agenţilor infecţioşi, sau la alte injurii tisulare (mecanice, termice, chimice). Clinic, procesul inflamator se caracterizează prin semne locale: roşeaţă (rubor), edem (tumor), căldură (calor), durere (dolor) şi tulburări funcţionale (functiolesa).

Evenimentele ce au loc în inflamaţie sînt schematizate în figura 2.5.

Leziunea tisulară antrenează iniţial vasodilataţia şi creşterea permeabilităţii capilare, cu modificări ale celulelor endoteliale, care determină adeziunea şi agregarea plachetelor; din aceasta rezultă activarea unor factori cu rol de meditori ai procesului inflamator (serotonină, sistem kininoformator). Totodată se produce marginaţia leucocitelor, urmată de diapedeza PMN, ulterior a monocitelor şi limfocitelor, care se deplasează

Scanned with OKEN Scanner

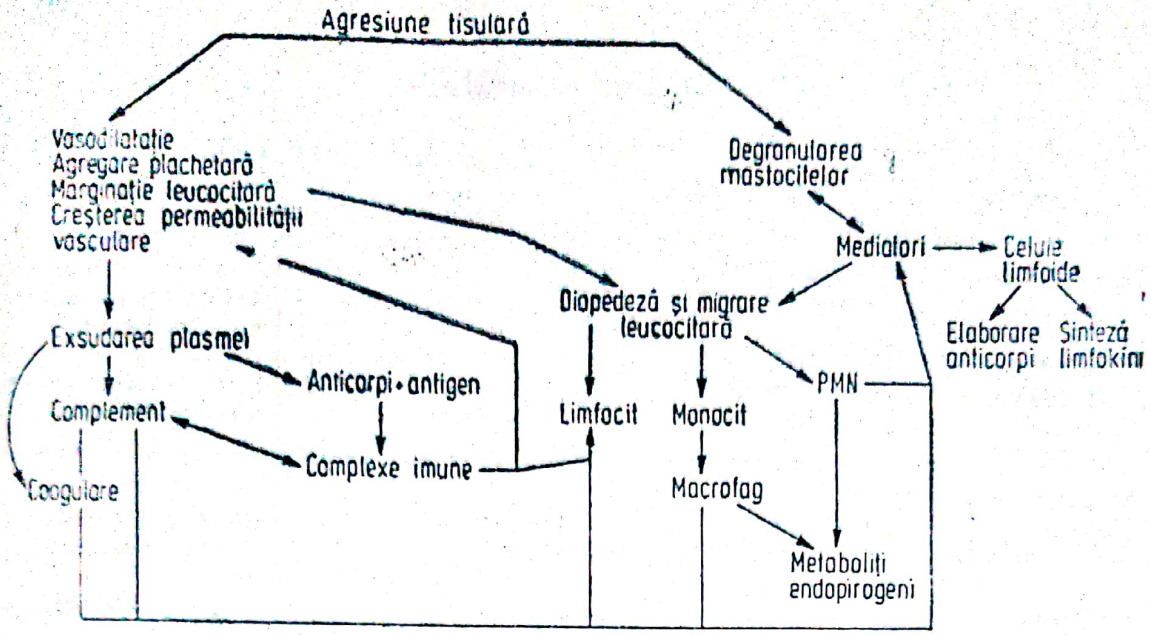


Fig. 2.5. Evenimente care au loc în inflamație.

dirijat spre locul injuriei tisulare, sub acțiunea factorilor chemotactici (vezi fagocitoza). Fagocitele înglobează și digeră microorganismele din focarul inflamator. În cursul fagocitozei se acumulează metaboliți care scad pH-ul local, se eliberează din fagocite endopirogeni și substanțe care pot declanșa degranularea mastocitelor cu eliberarea unor mediatori de tipul histaminei, cu rol în accentuarea procesului inflamator.

Alte procese ce apar în focarul inflamator țin de exsudarea plasmei, care aduce în țesutul lezat:

— fibrinogen, ce se transformă într-o rețea de fibrină, care, înconjurînd focarul inflamator, caută să localizeze infecția. Microorganismele care secretă fibrinolizină pot străbate această barieră diseminînd în organism;

— factori bactericizi din sînge: beta-lizine, lizozim;

— complement, care activat pe cale clasică (prin complexe imune), sau pe cale alternativă, constituie un mediator important al inflamației;

— anticorpi, care formează complexe imune cu antigenele corespunzătoare, declanșînd activarea C′, cu eliberarea de fracțiuni cu rol chemotactic și anafilatoxic, întărind reacțiile inflamatorii.

Prezența limfocitelor alături de macrofage contribuie la inițierea răspunsului imun în focarul inflamator.

Inflamația trebuie privită, în primul rînd, ca proces de rezistență naturală, cu tendința de localizare și inactivare a microorganismelor, deși întotdeauna sînt prezente și alterări tisulare. Dacă răspunsul inflamator va avea un efect favorabil sau nefavorabil, depinde de echilibrul dintre leziunile tisulare și mecanismele de inactivare a microorganismelor. Amplificarea alterărilor tisulare, observată uneori în inflamația imună, poate declanșa îmbolnăviri cu mecanism imunopatologic.

Un rol central în declanșarea și dezvoltarea procesului inflamator revine unor factori serici și celulari, cunoscuți ca mediatori ai inflamației (tabel 2.14). În mod obișnuit acești factori se află în stare inactivă în

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.14

Mediatori ai inflamației

Substanța	Natura chimică	Origine	Acțiune
Amine biogene :			
Histamina	β-Imidazolil-etil-amină	Mastocite	Crește permeabilitatea vaselor mici
Serotonina	5-Oxitriptamină	Bazofile. Trombocite	
Catecolamine	Noradrenalină Adrenalină	Terminații simpatice, suprarenale	Normalizarea permeabilității
Sistem kallikrein-kinină :			
Kinine	Polipeptide	Plasmă	Crește permeabilitatea
Factor Hageman	Globulină proteazică	Plasmă	Crește permeabilitatea
Plasmină	Protează	Plasmă	Crește permeabilitatea
Complement	Proteine plasmatice	Celule SRE	Chemotaxie, vasodilatație, crește permeabilitatea
Leukokinine Enzime lizozomale	Polipeptide Proteine intracelulare	Leucocite PMN, macrofage, mastocite	Crește permeabilitatea Fagocitoză, chemotaxie
Limfokine	Proteine intracelulare	Limfocite stimulate	Reacții imune
Substanța lent reactivă, anafilactică	Acid gras	Leucocite	Crește permeabilitatea, contractura musculaturii netede, prezentă mai ales în inflamația imună
Sistem prostaglandintromboxan	Acizi grași	Precursori prezenți în toate celulele, cu excepția eritrocitelor	Cresc permeabilitatea, chemotaxie, modulează inflamația

celule sau ca precursori inactivi în umori. Activarea lor se produce ca urmare a modificărilor din focarul inflamator (leziuni celulare, formare de complexe imune etc.). Un rol deosebit de important, ca mediator al inflamației, revine sistemului complement, care activat prin complexe imune, sau pe cale alternativă, promovează vasodilatația capilară și creșterea permeabilității, chemotaxia și fagocitoza, eliberarea de enzime lizozomale, lezarea unor membrane celulare.

Unele substanțe formate în focarul inflamator pătrund în circulația generală și determină modificarea unor proprietăți umorale, cunoscute ca *sindrom de fază acută* sau *sindromul umoral al inflamației*. Aceste modificări sînt cuprinse în tabelul 2.15.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.15

Sindromul umoral al inflamației

- Mărirea vitezei de sedimentare a hematiilor
- Hiperfibrinemie
- Creșterea cantității haptoglobinelor
- Creșterea activității transaminazelor serice (GOT, GPT)
- Apariția unei proteine particulare, numită proteina C reactivă
- Creșterea titrului complementului
- Creșterea proporției de PMN, care în prezența substanței denumită nitro-blue-tetrazoliu, formează în citoplasmă granule de formazan de culoare albastru închis. Se consideră că acest test poate ajuta la diferențierea inflamației bacteriene, de cea virală.

2.3. IMUNITATE ȘI IMUNOLOGIE. SISTEM IMUN. TIPURI DE IMUNITATE

În apărarea antiinfecțioasă, alături de rezistența naturală, intervine și **imunitatea cîștigată** sau **dobîndită,** cu mecanisme și sistem imunitar propriu, diferențiat pentru această funcție. Ea are un caracter specific, direcționată față de agentul inductor. Această caracteristică a fost sesizată de multă vreme, prin observația că subiectul care a trecut printr-o infecție este ferit de o a doua îmbolnăvire. Consecința practică a constat în introducerea *metodei variolizării* (provocarea intenționată a unei variole cu evoluție benignă), în urmă cu 30 de secole, în China. Pasteur a demonstrat că un microorganism determină cauzal o infecție și, tot el este și inductorul imunității, fundamentînd științific metoda prevenirii infecțiilor prin *vaccinare*. De aceea, imunitatea s-a dezvoltat ca un proces de cunoaștere biologică, predominant în conexiune cu factorul infecțios. Mai tîrziu s-a văzut că procese identice cu cele caracteristice imunității infecțioase se produc și sub efectul inductor al unui mare număr de substanțe cu proprietăți antigenice, dacă ele ajung în intimitatea țesuturilor.

S-a trecut astfel de la *Imunitate* la *Imunologie* ca știință a proceselor biologice declanșate în organism în urma pătrunderii unei substanțe cu proprietăți antigenice, știință a proceselor ce se produc prin recunoașterea și reacția față de propriu (self) și străin (non self). Se includ de aceea în sfera imunologiei și procese imune cu efecte nocive, ducînd la stări patologice (ramură cunoscută ca *Imunopatologie*).

Despre celulele care constituie sistemul imun (S.I.), nu s-a știut decît foarte puțin, pînă la datele publicate în 1959 de Gowans, care au centrat atenția asupra limfocitului. În ultimele două decenii s-au acumulat cunoștințe, care fac posibilă o cunoaștere a structurării și funcționării S.I.

S-a precizat că procesele imune apar în evoluția filogenetică la peștii primitivi, deci odată cu vertebratele și cunosc o amplificare și perfecționare continuă, pînă la mamifere. Instalarea proceselor imune coincide cu apariția țesutului limfoid, care recunoaște o dezvoltare paralelă cu cea a imunității.

Scanned with OKEN Scanner

2.3.1. SISTEMUL IMUN ŞI SISTEMUL LIMFOID

Imunitatea se realizează prin intervenţia sistemului limfoid, constituind funcţia lui specifică. Există două categorii importante de organe limfoide:

1. **Organele limfoide centrale** sînt timusul (primul care apare în evoluţia filo- şi ontogenetică) şi, la păsări, bursa lui Fabricius. La mamifere nu s-au putut defini echivalenţii bursei, fiind presupuse, fără dovezi precise, unele *structuri limfoide anexe intestinului (amigdale, plăci Peyer)* şi poate, cu argumente mai convingătoare, *măduva hematogenă.* Aceste organe furnizează limfocitele ce vor popula restul ţesuturilor limfoide din organism şi care în acelaşi timp devin competente în realizarea răspunsului imun.

2. **Organele limfoide periferice sînt** splina, ganglionii limfatici, măduva hematogenă, ţesuturile ce formează arcul limfatic al lui Waldayer, plăcile lui Peyer, apendicele şi insulele de ţesut limfatic, limfocitele disperse din mucoase şi, mai ales, submucoase (uneori se formează noduli limfatici). Acestea participă direct în realizarea răspunsului imun.

Din celula sursă limfoidă se diferenţiază *limfocitele T* (LT), *limfocitele B (LB)* şi *limfocitele nule.* În această diferenţiere limfocitele cîştigă o proprietate primordială, aceea de a reacţiona cu un singur antigen, devenind *celule imunocompetente,* capabile să participe în răspunsul imun. Caracteristicile care diferenţiază cele două populaţii principale LT şi LB se găsesc în tabelul 2.16.

Tabel 2.16

Caracteristici principale care diferenţiază LT şi LB

	Limfocit B	Limfocit T
— Morfologie	Nu apar caractere distincte	
— Receptori pentru antigen	IgM şi IgD	structură nedefinită
— Receptori pentru:		
Complement (C_{3b})	+	+
Complement (C_4)	+	−
Hematii de oaie (rozete neimune)	−	+
Hematii de Rhesus	−	+
Hematii de şoarece	+	−
— Răspuns la mitogeni:		
PHA, Con A	−	+
L.P.S.	+	−
— Receptori pentru virusuri:		
Epstein-Barr	+	−
Rujeolei	−	+
— N-acetilesterază	−	+
— Frecvenţa aproximativă (%) în:		
Sînge	15−30	55−75
Ganglioni	25	75
Canal toracic	<25	>75
Splină	50	50
Măduvă osoasă	>75	<25
Timus	<10	>90
— Imunoglobuline de suprafaţă în cantitate mare	+	−
— Antigen HTL−A	−	+
— Antigen HBL−A	+	−

Scanned with OKEN Scanner

Celula sursă după ce ajunge în timus, prin condițiile locale și acțiunea unor substanțe de tip hormonal elaborate de timus (timozină, timopoetină, factor umoral timic), se diferențiază în timocit și apoi în mai multe subpopulații de LT. Procesul de diferențiere continuă și în organele limfatice periferice, cu participarea factorilor timici, formînd linia de *celule timodependente*. LT se stabilesc în organele periferice în zone caracteristice numite *timodependente* și reprezintă principalele celule circulante. LT sînt răspunzătoare de **imunitatea mediată celular.**

Tot dintr-o celulă sursă, în bursa lui Fabricius sau în echivalentele acesteia de la mamifere, se diferențiază a doua populație, L.B. răspunzătoare de **imunitatea umorală** (fig. 2.6.) — cu mențiunea că *plasmocitul* diferențiat de LB este principala celulă producătoare de anticorpi.

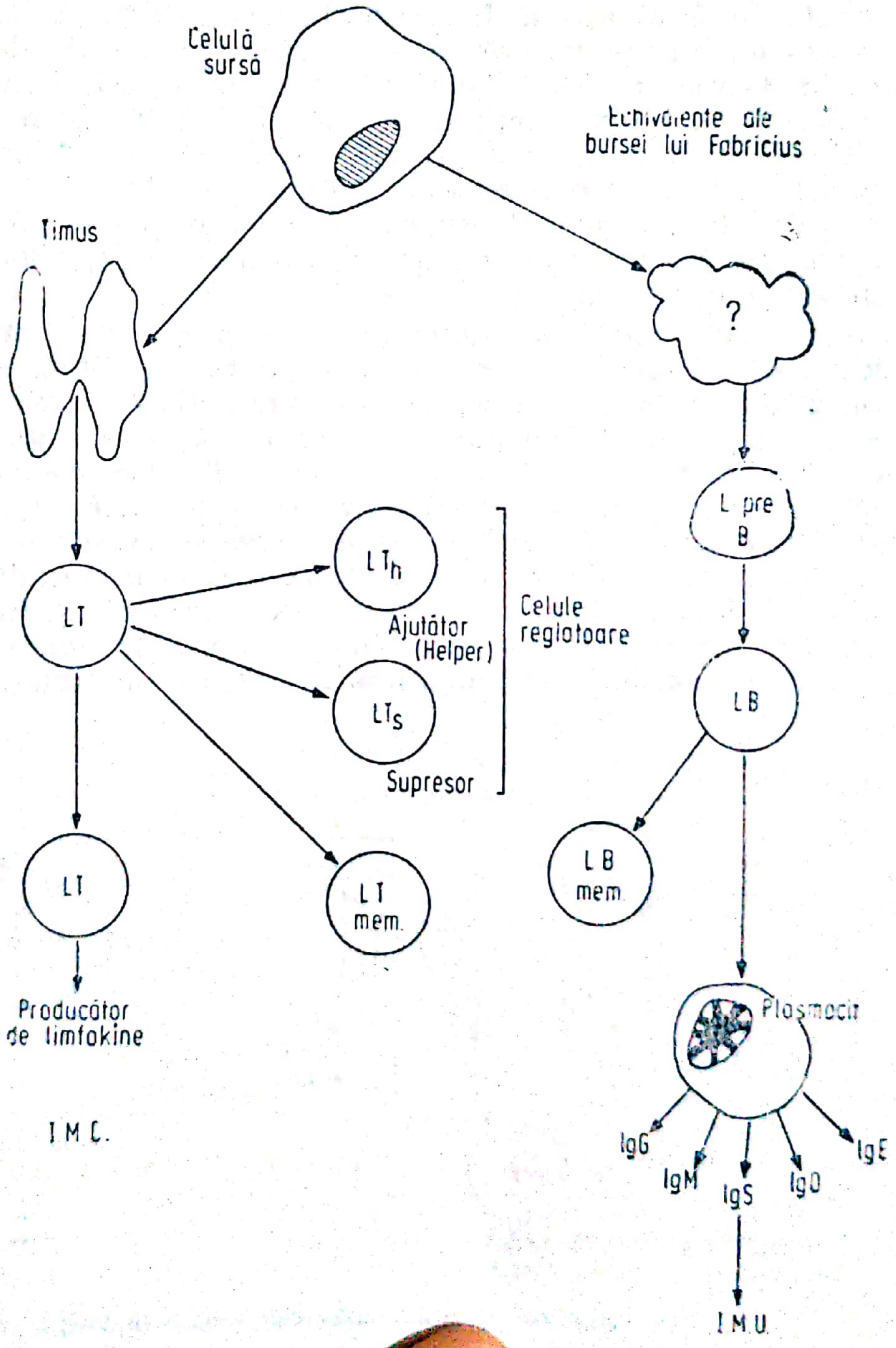


Fig. 2.6. Diferențierea populațiilor de limfocite.

Scanned with OKEN Scanner

La aceasta se adaugă o a treia populație de limfocite (2—10% din limfocitele din diferite organe, lipsite de markerii caracteristici ai LT și LB, numite limfocite nule. Este o populație heterogenă, în care intră celule ce produc citotoxicitatea dependentă de anticorpi, celule ucigașe (killer) naturale și precursori ai LB și LT.

Limfocitele de la multe mamifere, inclusiv de la om, își cîștigă imunocompetența în timpul vieții fetale, independent de antigen. La om, la 10 săptămîni de sarcină, limfocitele sînt reactive în reacție mixtă limfocitară față de aloantigenele adulte, iar feții sînt competenți să răspundă imunologic la sfîrșitul primei jumătăți a sarcinei, la unele antigene străine (Treponeme, Toxoplasma). Prin studii experimentale la animale s-a precizat că imunocompetența nu se instalează într-o singură treaptă, funcționînd de fapt o ierarhizare în timp în cîștigarea capacității de a reacționa față de diferiți antigeni din repertoriul antigenic al fiecărei specii. În felul acesta, în concordanță cu teoria selecției clonale a lui Burnet, în ontogeneză se diferențiază un număr de celule capete de clonă identic cu cel al determinanților antigenici, cu care organismul se întîlnește în timpul vieții și față de care reacționează imun. Capetele de clone față de structurile proprii devin tolerante, fiind deci recunoscute ca self; acestea se numesc *clone interzise*. Antigenele funcționează ca presori selectivi, acționînd asupra capetelor de clonă, declanșînd multiplicarea lor, formarea unor populații cu aceeași specificitate și mai ales a limfocitelor cu memorie.

În mod schematic dezvoltarea ontogenetică a limfocitelor se poate urmări în figura 2.7. Celula sursă, cu potențialitate multiplă, apare în sacul vitelin, apoi în ficat, unde se diferențiază în mai multe linii suplimentare pentru ca, cu puțin înainte de naștere și apoi tot restul vieții, măduva hematogenă să preia funcția de furnizare a celulelor sursă limfoide. Din ficat și apoi din măduvă, celulele sursă se diferențiază în cele două populații — LT și LB. Diferențierea și cîștigarea imunocompetenței este un proces complex, care se desfășoară în mai multe etape, cu modificări structurale (mai ales, markeri de suprafață) și funcționale gradate. Acestea pentru LT sînt mai bine cunoscute la șoarece, la care a fost posibilă o caracterizare a mai multor antigene alotipice. Așa cum se vede

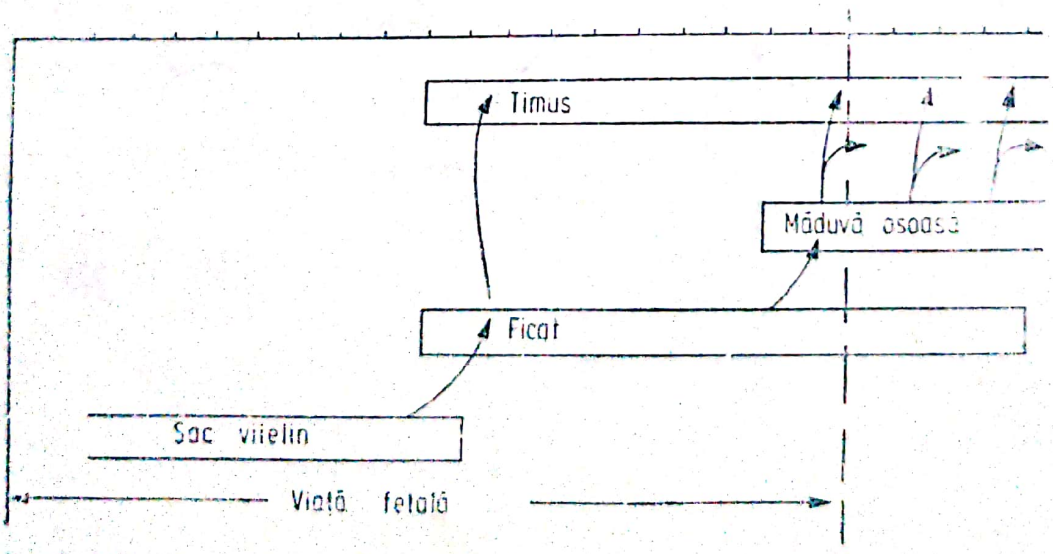


Fig. 2.7. Dezvoltarea ontogenetică a limfocitelor.

Scanned with OKEN Scanner

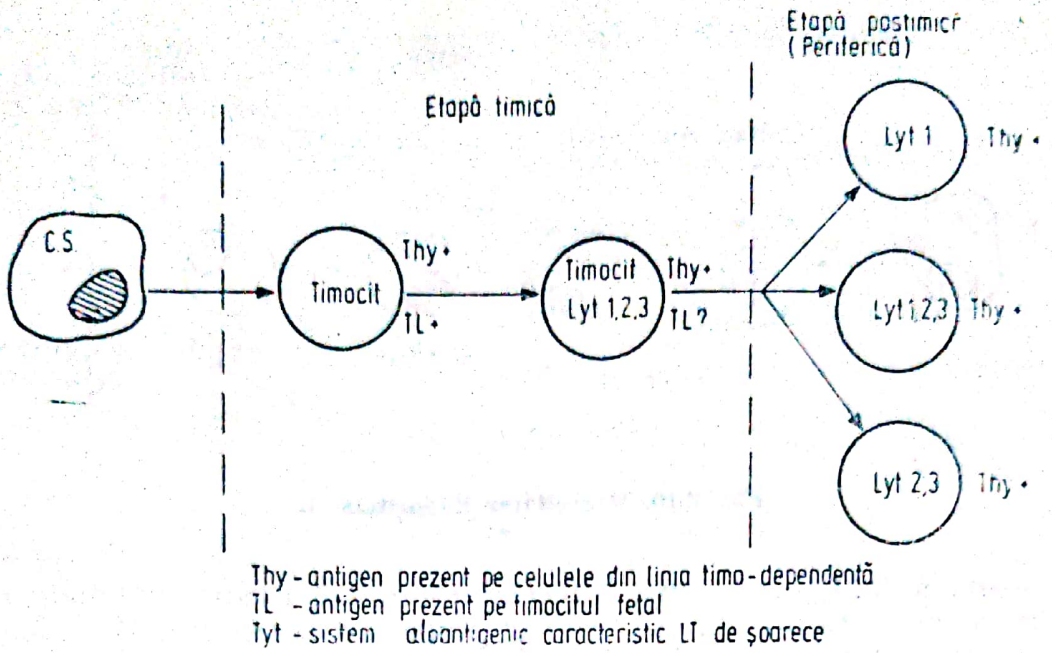


Fig. 2.8. **Dezvoltarea liniei timo-dependente la şoarece.**

în figura 2.8., se diferenţiază într-o fază timică şi una posttimică (periferică) mai multe subpopulaţii funcţionale de LT, dependente de dispariţia sau apariţia unor markeri antigenici. La om, din săptămîna 8—9 a vieţii fetale, timusul este populat cu celule limfoide, cu proliferare accentuată la început în corticală, de unde trec apoi în medulară. Cîştigarea competenţei se realizează şi la om în mai multe etape, cu constituirea de subpopulaţii funcţionale (fig. 2.9.).

În ontogeneza LB s-a constatat că din celula sursă se ajunge la celula denumită pre-B (săptămîna a 8-a), caracterizată prin prezenţa numai în

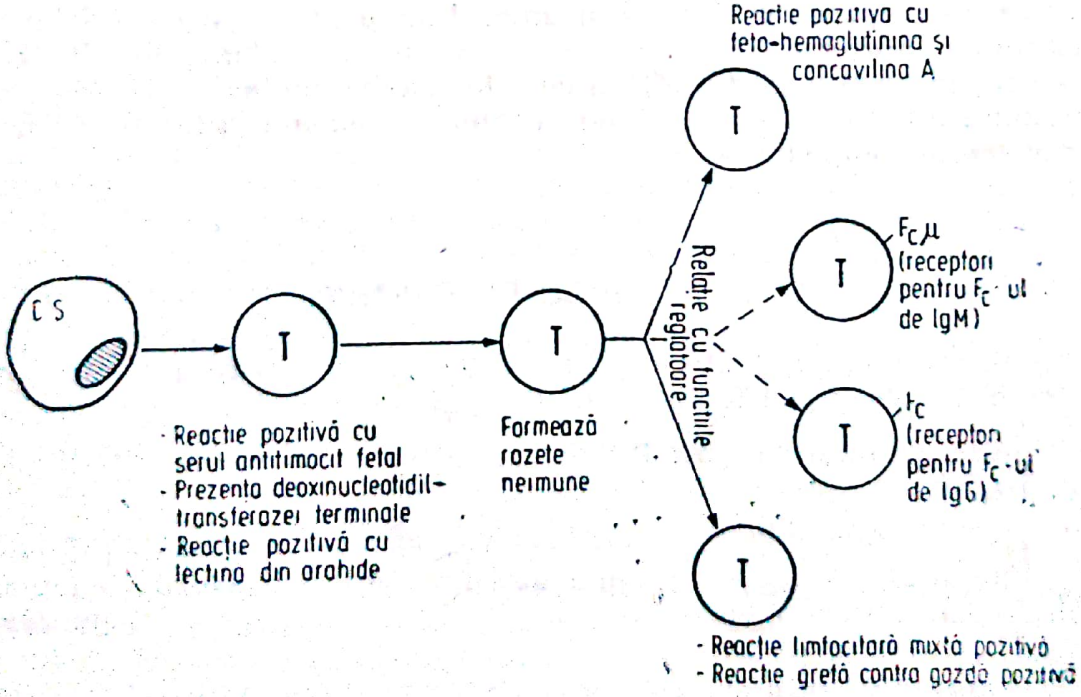


Fig. 2.9. **Dezvoltarea liniei timo-dependente la om.**

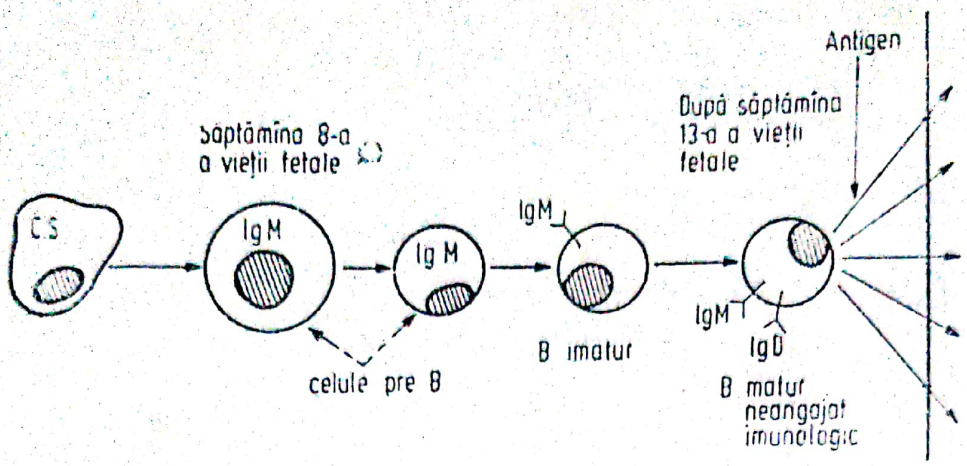


Fig. 2.10. Dezvoltarea limfocitului B.

citoplasmă a IgM, care, după diferențiere în LB imatur imunologic, cu IgM monomeric în membrană, trece în etapa următoare în LB competent, cu IgM și IgD în membrană (după săptămîna a 13-a). Sub stimularea antigenică se diferențiază subpopulații care produc clasele cunoscute de Ig (fig. 2.10). Capacitatea de răspuns imun cîștigată prin dezvoltarea ontogenetică este amplificată după naștere prin stimuli antigenici, mai ales de natură infecțioasă, care funcționează ca presori selectivi. Rezultă așadar, că în evoluția ontogenetică se diferențiază populații heterogene de limfocite, heterogenitate ce poate fi apreciată prin criterii morfologice (limfocit mic, mijlociu și mare, limfocite netede și cu vilozități), timpul de viață (L. cu viață scurtă și L. cu viață lungă), limfocit recirculant (mai ales LT), limfocite cu diferiți markeri de suprafață, proprietăți fizice (densitate, mobilitate, încărcare electrică) etc. Acesteia îi corespunde o heterogenitate funcțională.

Aceste populații heterogene de L formează sistemul limfoid, substratul morfo-funcțional al sistemului imun. Dar, pentru a-și realiza funcțiile importante, sistemul imun este conexat cu alte celule, numite celule accesorii, în primul rînd, SMF și cu alte sisteme biologice de amplificare a răspunsului imun, sistemul de coagulare, sistemul fibrinolitic și mai ales sistemul complement.

2.3.2. TIPURILE DE IMUNITATE

În această complexitate este necesară o sistematizare a manifestărilor imune prin definirea principalelor tipuri de imunitate.

Tipurile de imunitate pot fi definite, în raport, cu cîteva criterii importante (fig. 2.11.).

I. Astfel, **după celula răspunzătoare și efectorii imunității** se disting:

a. *imunitatea umorală,* numită astfel, deoarece efectorii — imunglobulinele se găsesc în umori și mai ales în serul sanguin, răspunzătoare fiind LB și plasmocitul;

b. *imunitatea mediată celular,* cu celula răspunzătoare LT și avînd efectori subpopulația de LT citotoxică, limfokinele și macrofagul activat.

Scanned with OKEN Scanner

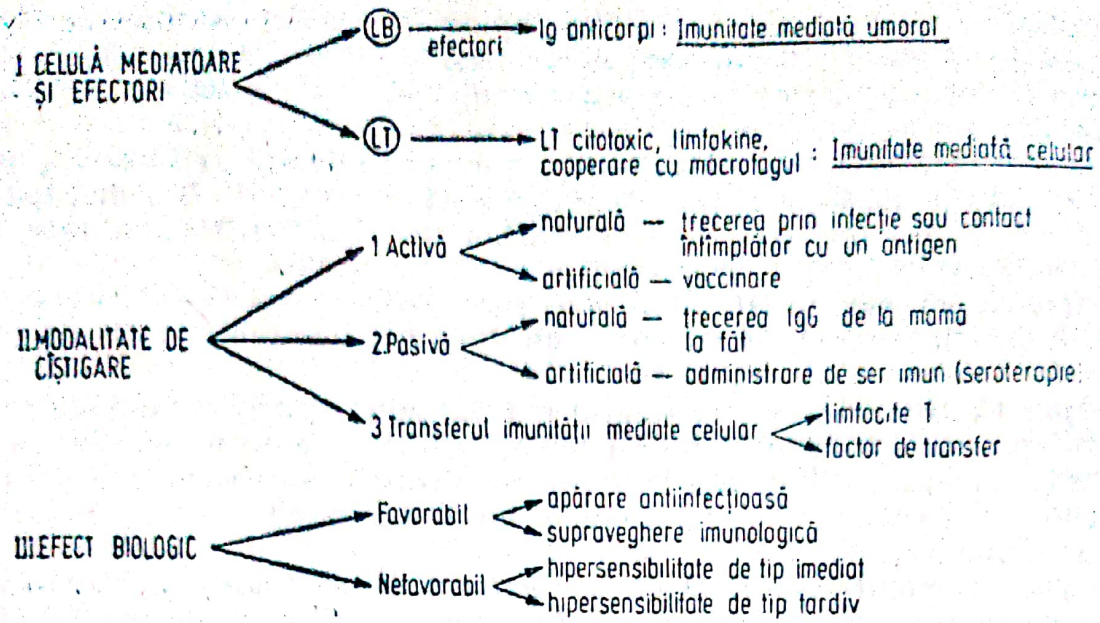


Fig. 2.11. **Criterii de definire a tipurilor de imunitate.**

II. După **modalităţile de cîştigare a imunităţii** se disting tipurile de:

a. *imunitate activă,* în care este angajat în urma stimulului antigenic S. I. propriu al organismului, acesta producînd efectorii imunitari. Este însoţită de apariţia limfocitului cu memorie şi are o durată lungă. Ea este *naturală* şi *artificială*. Această ultimă formă se obţine prin vaccinare, care constituie principala modalitate de profilaxie specifică în multe infecţii. Aceste forme de imunitate interesează atît imunitatea umorală, cît şi cea mediată celular;

b. *imunitatea pasivă,* care se realizează numai în imunitatea umorală şi poate fi la rîndul ei, *naturală* (congenitală), prin trecerea IgG de la mamă la făt, eventual IgA secretorii prin alăptare şi *artificială* prin administrarea de seruri imune sau concentrate de anticorpi, cunoscute ca gama-globuline. Se foloseşte în terapia bolilor infecţioase (seroterapie). Se instalează rapid, dar are durată scurtă (pînă la 6 luni în cazul celei naturale, 2—4 săptămîni pentru cea artificială);

c. *transferul imunităţii mediate celular* se face prin inoculare de LT obţinute de la un subiect imun sau printr-o limfokină, factorul de transfer. LT şi limfokina angajează pentru realizarea reacţiei imune sistemele celulare proprii ale organismului receptor, de aceea nu poate fi considerat acest transfer ca o imunitate pasivă.

III. După **efectul biologic** al sistemelor efectoare şi în primul rînd de păstrare a homeostaziei, poate fi: un efect favorabil de *apărare antiinfecţioasă* şi de *supraveghere imunologică,* constînd în îndepărtarea celulelor proprii îmbătrînite şi transformate tumoral.

În anumite condiţii relaţiile între antigen şi efectorii specifici faţă de acesta pot declanşa manifestări patologice, cu alterări tisulare, consecinţă a proceselor inflamatorii declanşate de procesele imune. Aceste stări sînt cunoscute sub termenul de **hipersensibilitate.** Apariţia acestora ţine, în primul rînd, de condiţii de ordin cantitativ. Efectul biologic favorabil de funcţie de păstrare a homeostaziei presupune un echilibru între efectorii sistemului imunitar şi agentul străin, avînd ca rezultat eliminarea acestuia din organism sau neutralizarea efectelor sale nocive. Perturbarea acestui

Scanned with OKEN Scanner

echilibru cu apariţia unei reacţii de amploare, depăşind cu mult un anumit prag cantitativ între antigen şi efectorii imunitari, de cele mai multe ori în teritorii circumscrise ale organismului, determină *stările de hipersensibilitate,* care pot fi:

a. *tip imediat,* în care intervin ca efectori anticorpii, cu apariţie rapidă, brutală, după introducerea antigenului în ţesuturi. Din multiplele încercări de sistematizare a manifestărilor de hipersensibilitate, este, în general, acceptată cea propusă de Gell şi Coombs:

tipul I, cu manifestări citotrope, care definesc stările de atopie la om, în care intervin IgE: urticaria, febra de fîn, astmul, şocul anafilactic etc.;

tipul II, citotoxic, este rezultatul reacţiei anticorpului cu antigene din suprafaţa celulei (din membrana citoplasmatică), cu activarea consecutivă a complementului. Sînt încadrate în acest tip: boala hemolitică a nou născutului, accidentele transfuzionale, unele tipuri de glomerulo-nefrite acute imune etc.;

tipul III, manifestări produse de complexe antigen-anticorp circulante cu participarea complementului ca: fenomenul Arthus, boala serului etc.

b. *de tip tardiv* (tipul IV după Gell şi Coombs), avînd ca prototip reacţia la tuberculină, manifestare ce apare în cadrul imunităţii celulare. În producerea ei intervine limfocitul T şi unele din limfokinele produse de acesta.

2.4. ANTIGEN. IMUNGLOBULINE. COMPLEMENT

2.4.1. ANTIGENUL

Antigenul (Ag) a fost definit multă vreme ca o substanţă, care, după ce a pătruns în organismul unui animal, declanşează formarea de anticorpi (Ac), cu care reacţionează specific, în mod vizibil. În momentul de faţă această definiţie nu mai este corespunzătoare, din mai multe motive. Astfel, există unele substanţe care nu sînt capabile de a induce formarea de Ac, dar pot reacţiona vizibil cu aceştia (haptene). Pe de altă parte, substanţele cu proprietăţi antigenice, prin interacţiunea specifică cu limfocitele, pot induce răspuns imun ce se manifestă prin imunitate umorală, mediată celular, sau uneori toleranţă imunologică. S-a introdus de aceea noţiunea de *imunogen,* definind o substanţă capabilă să inducă un răspuns imun şi să intre în reacţie specifică cu efectorii imunitari. Acest termen este aplicat, mai ales, moleculelor cu una sau puţine specificităţi, iar cel de antigen, structurilor complexe cum sînt cele reprezentate de bacterii, virusuri şi celule animale. Pînă la o delimitare mai precisă a acestor noţiuni ele se folosesc deocamdată ca sinonime. Principalele atribute ale unui antigen (imunogen) sînt:

I. **Imunogenicitatea,** condiţionată de mai multe proprietăţi:

1. **Condiţii filogenetice.** Ţinînd seama de una din proprietăţile fundamentale ale sistemului imunitar, şi anume acela de a discrimina propriul (self) de străin (nonself), pentru ca o substanţă să aibă proprietăţi de imunogenicitate, ea trebuie să fie *heterogenă,* adică să nu fie identică cu nici una din molecule proprii organismului. De aceea un imunogen trebuie să

Scanned with OKEN Scanner

aibă o *origine exogenă*. Faţă de structurile proprii, *endogene*, organismul este tolerant (nu declanşează un răspuns imun). Există antigene endogene caracteristice de specie, adică ele sînt identice la toţi membrii aceleiaşi specii şi caracterizează imunologic proteinele serului şi antigenele celulare ale fiecărei specii. Cu cît însă un imunogen provine de la o specie mai îndepărtată filogenetic, el este mai puternic. De aceea, microorganismele sînt Ag puternice.

Reacţiile care apar în grefele de ţesuturi şi organe au atras atenţia asupra existenţei pe suprafaţa celulelor respective a unor Ag care induc răspuns imun din partea receptorului, urmat de respingerea grefei. Aceste Ag nu diferă de la un organ la altul, ci de la individ la individ. Ele sînt controlate de grupe de gene strîns legate între ele, localizate pe un anumit cromozom, alcătuind complexul major de histocompatibilitate (C.M.H.). La om, acest complex prezent pe cromozomul 6, a fost denumit *sistemul HLA;* la şoarece prezent pe cromozomul 17 a fost denumit H-2 etc. În sistemul HLA s-au identificat 5 regiuni (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-DB), fiecare codificînd producerea de Ag specifici; mai bine cunoscute sînt primele două. Au fost descrise peste 70 Ag (tabel 2.17), care variază de la un individ la altul (aloantigene), fiind însă identice la gemenii monovitelini (Ag singenice). Ele sînt prezente pe celulele diferitelor organe, granulocite, limfocite, trombocite şi chiar hematii.

Tabel 2.17

Regiunile sistemului HL_A şi antigenele controlate (cromozomul 6)

Regiunea	HL_A-A	HL_A-B	HL_A-C	HL_A-D	HL_A-DB
Nr. Ag codificate	20	33	6	11	7
Antigene	HL_A-A_1	HL_A-B_5	HL_A-C_{w1}	HL_A-D_{w1}	HL_A-DB_{w1}
	HL_A-A_2	HL_A-B_7	HL_A-C_{w2}	HL_A-D_{w2}	HL_A-DB_{w2}
	etc	etc	etc	etc	etc
Localizare	Ag pe limfocite, hematii, celule tisulare				

Regiunile sistemului H—2 şi antigenele controlate (şoarece-cromozomul 17.)

Regiunea	K	I	S	D
Subregiunea	—	Ir—1A, Ir—1B, I—C	—	—
Ag codificate	K	Lyt—1, Lyt—2, Lyt—3, Lyb—4, Lyb—5, I_a etc.		D
Localizare	Ag de membrane celulare	Ag de pe limfocite T, B şi macrofage	Ag de proteine serice(C)	Ag de membrane celulare

Pe lîngă controlul, realizat de genele CMH, în această porţiune cromozomială există şi gene care modulează răspunsul la Ag specifici.

Deşi individul recunoaşte Ag omologe ca şi proprii, există unele substanţe ale organismului care în mod normal sînt izolate şi ca atare nu vin în contact cu sistemul limfoid, cu ocazia maturării imunologice (Ag din cristalin, tiroidă, creier, gonade). Dacă în cursul vieţii ele vin în contact accidental cu sistemul imunitar, se declanşează răspunsul imun (autoantigene-boli autoimune).

2. **Condiţii fizico-chimice.** Pentru ca o substanţă să fie antigenică, ea trebuie să aibă o greutate moleculară mare de peste 10 000. Se apreciază, în general, că cu cît o substanţă are o masă moleculară mai mare, cu atît este un imunogen mai puternic. Există şi unele excepţii, obţinîndu-se

Scanned with OKEN Scanner

un răspuns imun de un nivel scăzut cu unele peptide obținute prin sinteză chimică (masă moleculară 1080) sau față de angiotensină (masă moleculară 1031). Această relație dintre talia moleculei și calitatea de imunogen trebuie pusă în legătură cu necesitatea ca imunogenul să reacționeze cu receptorii de pe membrana citoplasmatică a celulei limfoide în așa fel, încît să producă o distorsionare a structurii acesteia, care să constituie un semnal pentru declanșarea proceselor celulare care vor duce la răspunsul imun.

Rezultă că imunogenele sînt substanțele organice macromoleculare: proteice, polizaharide, lipide, acizi nucleici. Dintre acestea proteinele sînt imunogenele cele mai puternice. Lipidele pure sînt neantigenice. Majoritatea antigenelor naturale sînt reprezentate de complexe moleculare: lipoproteine, lipopolizaharide (lipidul funcționează ca haptenă sau adjuvant), glicoproteine (componenta polizaharidică avînd rol de haptenă), nucleoproteine.

Pentru ca o moleculă să fie imunogenă trebuie să posede un grad apreciabil de rigiditate. În cazul proteinelor, rigiditatea este conferită de conținutul de aminoacizi aromatici. Gelatina săracă în astfel de aminoacizi, este un slab imunogen, avînd o moleculă cu rigiditate scăzută.

La acestea se adaugă necesitatea de remanență în organismul animal. Moleculele lipsite de rigiditate sînt eliminate repede din organism, motiv pentru care au imunogenicitate redusă.

3. **Condiții de gazdă.** Răspunsul imun față de un imunogen este dependent de specia și individul în a căror țesuturi pătrunde. Există variații mari în amploarea reactivității imunologice față de același imunogen de la o specie la alta, și variații individuale în cadrul aceleiași specii. Organismul gazdă trebuie să recunoască imunogenul și să-l metabolizeze. Se consideră, în general, că apariția unui răspuns imun față de un antigen este dependentă, în afară de proprietățile acestuia, de prezența în gazdă a unor gene de recunoaștere a Ag, legate de sistemul major de histocompatibilitate (genele Ir).

II. **Specificitatea** se datorește unor porțiuni reduse de pe suprafața Ag, care alcătuiesc grupările determinante. În cazul Ag de natură polizaharidică, prezente la bacili gramnegativi, s-au obținut informații foarte utile prin studii realizate asupra AgO al salmonelelor. Situat la suprafața peretelui celular lipopolizaharidului este alcătuit din trei regiuni principale (fig. 2.12):

— prima, cea internă, reprezintă lipidul A (de fapt un glicolipid), constituit din glucozamină, etanolamină și o cantitate mare (60—70%) de acizi grași (lauric, miristic, palmitic etc.). Este responsabil de toxicitatea complexului;

— a doua regiune, sîmburele polizaharidic, a fost separată arbitrar într-o zonă internă și alta externă. Constituentul principal al zonei in-

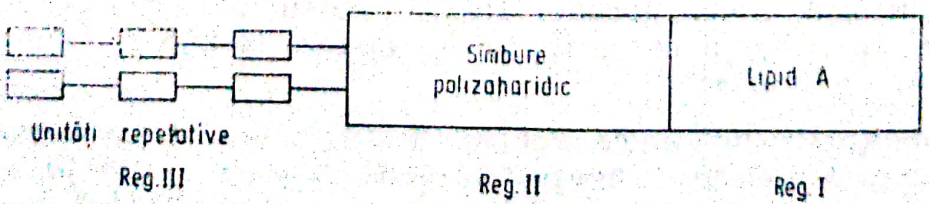
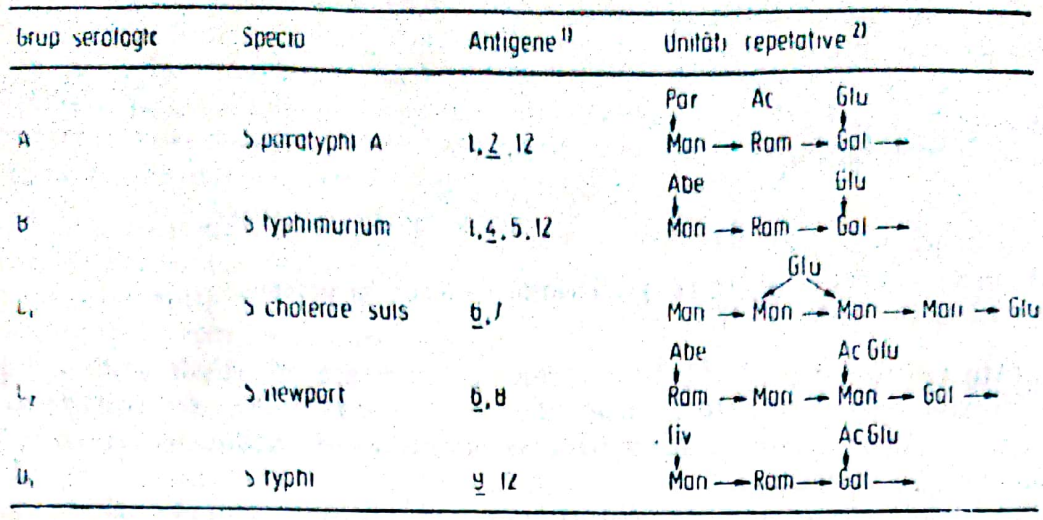


Fig. 2.12. Schema lipopolizaharidului la bacterii gramnegative (AgO)

Scanned with OKEN Scanner



1 Cifrele subliniate reprezintă factorii antigenici specifici de grup
2 Ac - acetil Man - manoză Ram - ramnoză Gal - galactoză Glu - glucoză,
Par - paratoză (S paratyphi) Abe - abequoză (S abortus equi), liv - tivelozâ (S typhi)

Fig. 2.13. Lanţurile variabile de monozaharide la cîteva salmonele.

terne este acidul cetodioxioctonic, legat de glucozamina lipidului A; zona externă se compune din glucoză, galactoză şi N-acetil-glucozamină. Toate salmonelele au un sîmbure polizaharidic comun, care diferă însă de cel al Shigellelor şi Escherichiilor;

— a treia regiune conţine lanţurile variabile constituite din unităţi repetitive, compuse din 3—6 monozaharide (manoză, ramnoză, glucoză etc.) şi unele 3,6-dideoxihexoze, unice enterobacteriilor şi care au fost denumite după bacteriile la care s-au observat prima dată (tiveloză, paratoză, abequoză etc.). Specificitatea Ag se datoreşte ordinei în care sînt aşezate monozaharidele şi tipului de legătură. Orice modificare duce la schimbarea specificităţii (fig. 2.13). În acest fel se explică specificitatea factorilor antigenici O ai salmonelelor, care permite clasificarea acestora în peste 1500 de specii.

Specificitatea grupărilor determinante la proteine este şi ea în funcţie de secvenţa aminoacizilor, aceasta, mai ales, la polipeptidele sintetice liniare. La moleculele proteice globulare, ariile de suprafaţă care constituie grupările determinante sînt alcătuite din aminoacizi situaţi în poziţii întîmplătoare în secvenţa lor. În urma modelării moleculei, datorită structurii secundare şi terţiare, aceste resturi de aminoacizi se învecinează, formînd gruparea determinantă; aceasta trebuie să se găsească la suprafaţa moleculei.

Specificitatea unei grupări determinante depinde, în final, de configuraţia sterică, de forma ei geometrică, care este complementară poziţiei de recombinare prezentă pe Fab-ul imunglobulinic.

Orice modificare în structura primară, secundară şi terţiară, care atrage după sine o schimbare în configuraţia grupării determinante, duce la o nouă specificitate.

Un antigen natural prezintă în majoritatea cazurilor mai multe grupări determinante, numărul acestora formînd *valenţa Ag*. Cu cît o moleculă are o masă moleculară mai mare, cu atît va avea un număr mai mare de grupări determinante, cu specificităţi diferite. Microorganismele şi în consecinţă bacteriile posedă numeroase Ag situate, mai ales, la

Scanned with OKEN Scanner

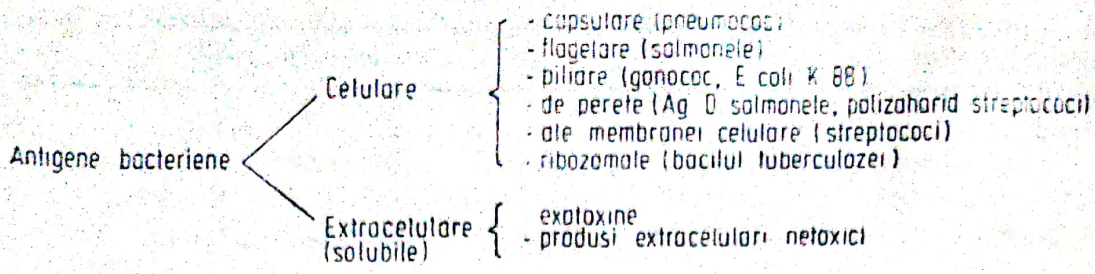


Fig. 2.14. Principalele antigene bacteriene.

suprafața celulei (fig. 2.14). Studierea acestora are multiple aplicații practice, dintre care amintim: cunoașterea mecanismelor de patogenie ale infecțiilor, clasificarea și identificarea bacteriilor, diagnosticul serologic, prepararea de vaccinuri.

Haptenă-antigen complet (imunogen). O haptenă sau jumătate de antigen este o substanță care inoculată într-un organism animal este lipsită de capacitatea de a induce sinteza anticorpilor, dar intră în reacție cu Ac specifici. Astfel: extractul polizaharidic din capsula pneumococilor nu poate induce răspuns imun la iepure. Dacă acesta este imunizat cu celule bacteriene (pneumococi), are loc producerea de anticorpi care intră în reacție specifică cu polizaharidul extras din celule.

În foarte multe antigene naturale, componenta polizaharidică are funcția de haptenă și conferă în mare parte specificitatea antigenului. Lipidele sau polipeptidele din antigene mai rar pot juca acest rol. Este posibil prin sinteză chimică să se cupleze o haptenă (polizaharidică, oligozaharidică) cu o moleculă proteică, obținîndu-se un antigen complet, sau altfel zis, un imunogen. Molecula proteică poartă numele de *purtător* (carrier) *de haptenă.* Într-un astfel de antigen există grupări (determinanți antigenici) cu specificitate caracteristică de haptenă și altele proprii purtătorului. În plus, din interacțiunea haptenă-purtător pot să apară grupări determinante cu specificitate diferită, rezultate de pe haptenă și de pe purtător.

În declanșarea răspunsului imun față de un astfel de antigen, determinanții (grupările determinante) de pe haptenă sînt răspunzători predominant de imunitatea de tip umoral, în timp ce imunitatea de tip celular apare față de determinanții haptenici, dar mai ales, față de cei ai purtătorului.

Aceste cunoștințe pot explica apariția răspunsului imun față de substanțe organice cu moleculă mică (de exemplu, penicilina, aspirina) sau chiar anorganice. Inoculate în organismul animal, inclusiv la om, ele se pot combina cu proteinele proprii acestuia, cîștigînd proprietatea de imunogen și declanșînd procese de imunitate de tip umoral și/sau celular. La o nouă inoculare, în condiții particulare, pot declanșa fenomene de hipersensibilitate imediată și/sau tardivă.

2.4.2. IMUNGLOBULINELE

Imunoglobulinele (Ig) constituie un complex heterogen de glicoproteine globulare cu funcție de anticorp (Ac), sintetizate în urma stimulului unui antigen (Ag). Dacă nu pentru toate Ig poate fi detectată funcția de

Ac (de exemplu, multe din globulinele patologice mielomatoase), toți Ac aparțin imunglobulinelor. Ele au proprietăți comune, avînd la baza structurii un monomer alcătuit din 4 lanțuri polipeptidice, care la unele Ig se polimerizează. Utilizarea metodelor biochimice de studiu a proteinelor și caracterizarea antigenică au arătat neobișnuita heterogenitate a Ig și prin aceasta, poziția lor particulară între proteine.

A. Structura moleculară a Ig a putut fi definită mai ales datorită cercetărilor inițiate de Porter, Nisonoff și Edelman prin fragmentarea enzimatică a unor preparate de anticorpi omologi și prin stabilirea secvenței primare de aminoacizi.

Așa cum se vede în figura 2.15 un monomer de 7S este alcătuit din două lanțuri grele (H = heavy) și două lanțuri ușoare (L = light). Lanțurile H se leagă între ele prin mai multe legături S — S, iar fiecare lanț L se leagă de un lanț H printr-o punte S—S, obținîndu-se o structură L—H—H—L. Secvența de aminoacizi a evidențiat că în fiecare lanț există:

— o *porțiune variabilă,* cu diferențe mari între Ig, reprezentînd jumătate din lanțul L (107 aminoacizi) și notată cu V_L și 1/4 din lanțurile H (110 aminoacizi) notată V_H;

— o *porțiune constantă,* în care se înregistrează variații minime între Ig și care constă din jumătate din lanțul $L(C_L)$ și 3/4 din H, notată C_H. Semnificativă este variabilitatea din V_L și V_H pentru formarea poziției (situsului) de combinare cu Ag, și mai ales existența unor regiuni hipervariabile (fig. 2.16).

Pentru conformația moleculară este importantă prezența legăturilor S—S intralanț, prin care se realizează bucle formate din 60—80 aminoacizi numite *domenii,* cu participare caracteristică în funcțiile Ig: două domenii în lanțurile L superpozabile cu V_L și C_L și patru în lanțurile H notate V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, (la IgM și IgE se adaugă domeniul C_{H4} (fig. 2.17). IgG, IgD și IgE sînt monomerice, pe cînd IgM sînt formate din 5 mo-

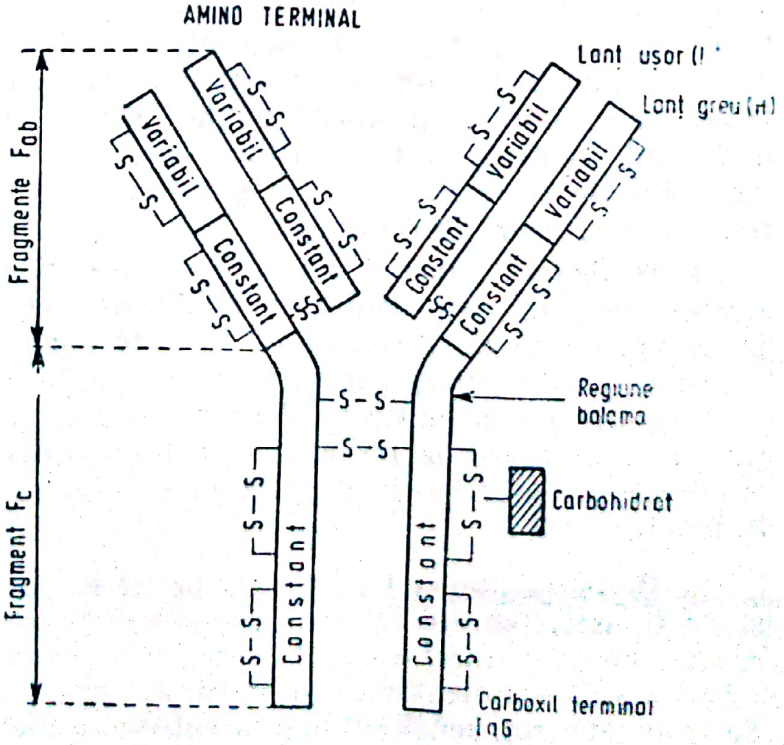


Fig. 2.15. Structura moleculară a monomerului 7S de imunglobulină.

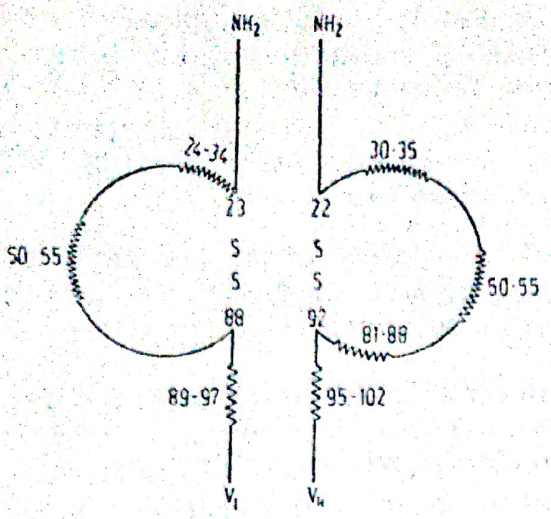


Fig. 2.16. Regiune hipervariabilă din monomerul imunoglobulinic (după I. Moraru).

nomeri, unele IgA din doi monomeri legați prin punți S--S prin intermediul unei piese de legătură, notată J (joining) (fig. 2.18). La toate Ig se găsesc mai multe unități glucidice, ceea ce face ca Ig să intre în categoria *glicoproteinelor*.

Prin degradarea enzimatică a monomerilor de Ig s-au putut identifica mai multe fragmente. Papaina scindează molecula în 3 fragmente: două sînt identice, constituite fiecare dintr-un lanț L și o porțiune egală de lanț greu, notate Fab (fragment antigen binding), care au proprietatea de a lega fiecare un determinant antigenic. Al treilea fragment, constituit din restul lanțurilor grele, este numit Fc (fragment cristalizabil) și are funcții biologice proprii (v. fig. 2.15). Pepsina scindează molecula la un alt nivel, în așa fel că cele două Fab-uri rămîn legate printr-o punte S—S, rezultînd un fragment mare $F(ab)_2$, iar resturile de lanț H se scindează în mai multe peptide. Fiecare Fab legîndu-se cu un determinant antigenic formează un complex imun elementar, fără să poată da o reacție de agregare (precipitare), în timp ce $F(ab)_2$, legînd două grupări antigenice, poate forma un precipitat. Rezultă că un monomer are două valențe, sau cum se definesc, două poziții (situsuri) de combinare cu antigenul. Acestea sînt constituite din 10—15 aminoacizi din regiunile variabile ale lanțurilor L și H. Ig polimerice (Ig A, Ig M) posedă teoretic pînă la 10 situsuri de combinare.

În realizarea funcției de Ac, o mare importanță o are așa-numita *regiune balama,* care conferă flexibilitate Fab pe Fc, astfel că molecula poate lua formă de T sau de Y. Această particularitate este conferită de o structură particulară bogată în glicină și prolină (v. fig. 2.15 și 2.19).

Deși funcția de anticorp depinde în principal de Fab-uri și de pozițiile de combinare de pe acestea, pentru realizarea ei participă întreaga moleculă, inclusiv Fc-ul. Proprietățile biologice ale acestuia sînt rezumate în tabelul 2.18.

B. **Heterogenitatea Ig.** Prin proprietățile lor fizico-chimice, antigenice și de funcție, familia Ig s-a dovedit a fi foarte heterogenă. În definirea acestei heterogenități sînt utilizate cîteva criterii: greutatea moleculară, constanta de sedimentare, conținutul în carbohidrați, durata de viață (timp de înjumătățire), sensibilitatea la substanțe reducătoare (mercaptoetanol).

Scanned with OKEN Scanner

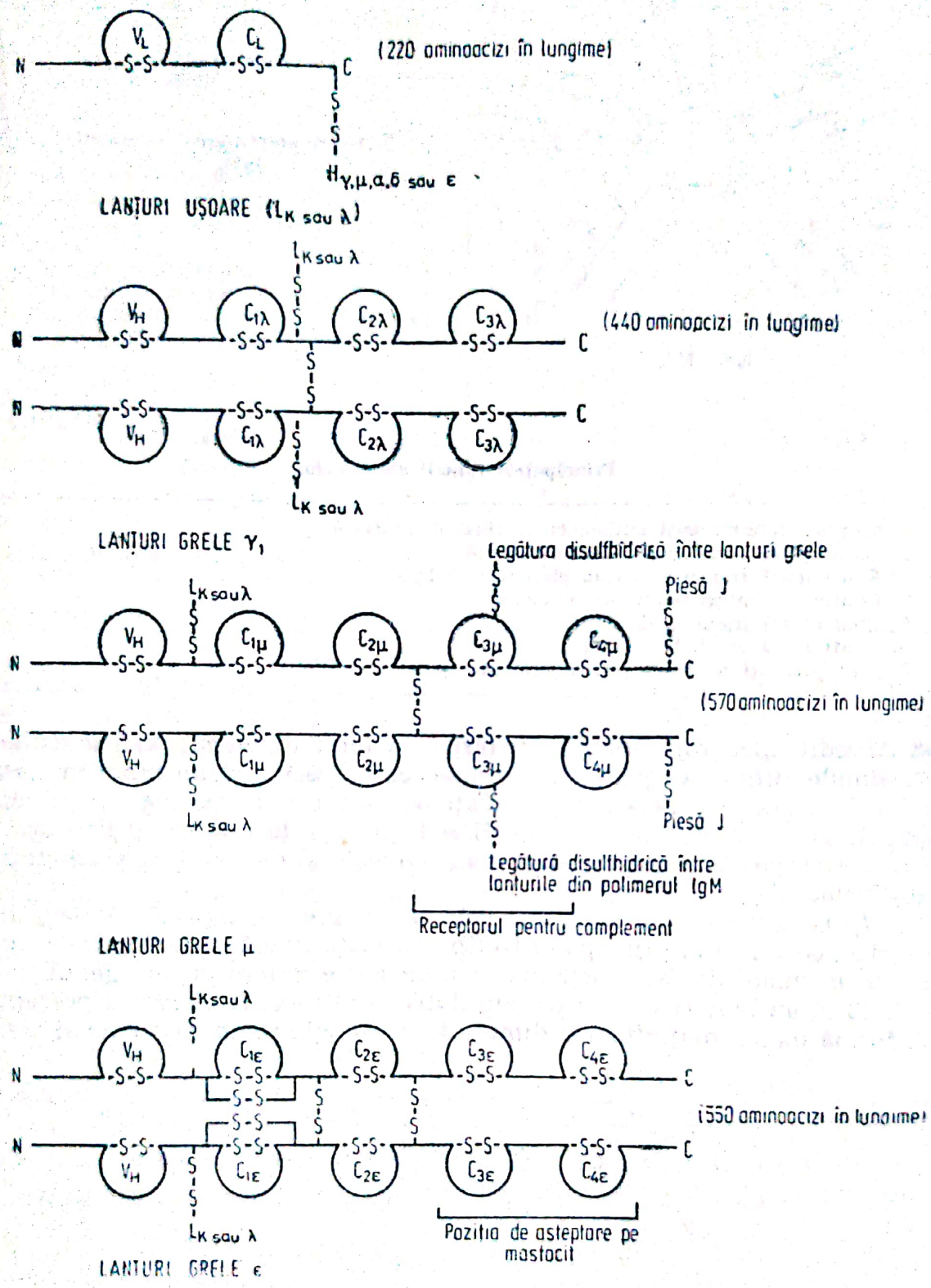


Fig. 2.17. Structura lanțurilor H și L cu formarea domeniilor în interiorul lanțurilor prin legături S—S intralanț. De subliniat că la IgM și IgE lanțurile H au 5 domenii (după Zinsser).

Scanned with OKEN Scanner

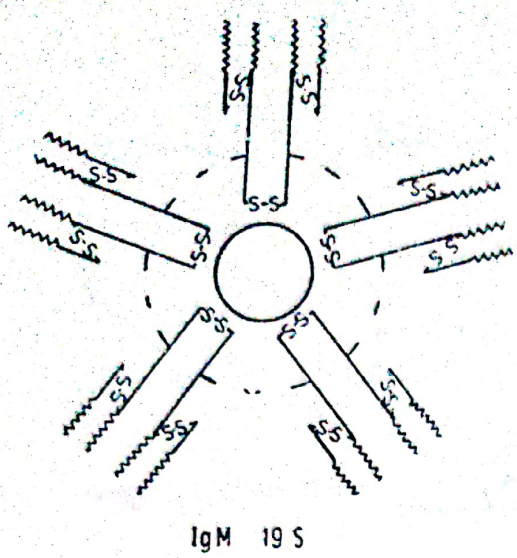


Fig. 2.18. **Reprezentarea schematică a IgM.**

Tabel 2.18

Principalele funcţii ale Fc-ului

1. Conţine determinanţi antigenici de clasă şi subclasă
2. Se ataşează componenta carbohidratică
3. Controlează transportul transplacentar al IgG
4. Conţine receptori pentru complement
5. Conferă proprietatea de citofilie
6. Controlează catabolizarea Ig
7. Sînt prezenţi receptori pentru proteina A de la stafilococ

S-a dovedit apoi importantă caracterizarea lor antigenică, prin inoculare la animale din altă specie sau din aceeaşi specie. Determinanţii antigenici de clasă şi subclasă sînt situaţi pe lanţurile H, cei de tip pe lanţurile L, cei de alotip pe lanţurile H şi L, iar cei de idiotip pe Fab-uri.

a. *Heterogenitatea de clasă* se mai numeşte şi de izotip. Există (tabel 2.19) 5 clase de Ig:

1. *Ig G* caracterizate antigenic prin lanţul greu γ, reprezintă 80% din Ig serice, constituind principalul izotip. Au viaţă lungă, sînt singurele care trec de la mamă la făt. Participă în numeroase reacţii cu antigenul.

2. *Ig A* au lanţ H α şi se disting după localizare: *Ig A serice* prezente sub formă mono (majoritar) şi dimerică, cu funcţie antimicrobiană şi anti-

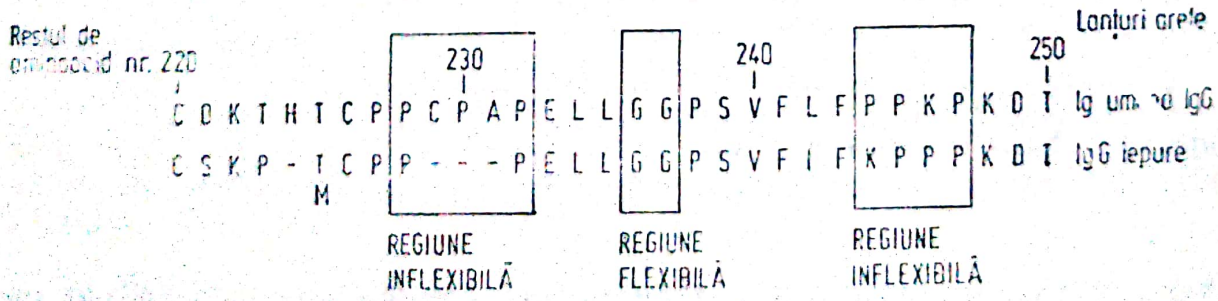


Fig. 2.19. Structura regiunii balama a imunglobulinei, cu secvenţa de aminoacizi pentru IgG umană, subclasa IgG_1.

Simbolul aminoacizilor: C — cisteină; D — Ac. aspartic; K — lizină; H — histidină; T — treonină; P — prolină; A — alanină; E — Ac. glutamic; L — leucină; G — glicină; S — serină; V — valină; F — fenilalanină; M — metionină; I — izoleucină. LT — Lyt (1 , 2 , 3) din care se diferenţiază subpopulaţiile; LT — limfocit supresor; LT — limfocit Helper; LB — limfocit B; Pl — plasmocit.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.19

Principalele proprietăţi ale imunglobulinelor

Proprietăţi	CLASE					
	IgG	IgA		IgM	IgD	IgE
		serice	secretorii			
– Mobilitate electroforetică						
– Constanta de sedimentare	7S	7S, 10S		19S	7S	8S
– Greutate moleculară ($\times 10^3$)	150	160—400	370	900	180	200
– Carbohidrat %	4	10		15	18	18
– Timp de înjumătăţire (zile)	23	6		5	3	2
– Concentraţie în sînge (mg/ml)	12	2,5		0,93	0,03	0,0005
– Procent din totalul Ig	80	16		4	0,01	0,0003
– Sensibilitate la mercaptoetanol	–	+		–	–	–
– Trecerea prin placentă	+	–		–	–	–
– Lanţuri grele (H)						
Clase	γ	α		μ	e	δ
Subclase	γ_1 70%	α_1		μ_1		
	γ_2 18%	α_2		μ_2		
	γ_3 8%					
	γ_4 3%					
– Lanţuri uşoare (L)						
Tip	$\varkappa$, λ	$\varkappa$, λ		$\varkappa$, λ	$\varkappa$,λ	$\varkappa$, λ
Alotip	Inv	Inv		Inv		

virusală. *Ig A* secretorie, cu dimeri de 11 S, cu gr. mol. 400.000, reprezentînd cantitativ principala Ig din secreţie, conferind proprietatea de *imunitate locală*. Cei doi monomeri sînt legaţi printr-o punte J, iar la trecerea prin celula epitelială se adaugă un polipeptid, numit componenta secretorie (fig. 2.20).

3. *Ig M* cu lanţul H caracteristic μ, găsită în ser şi în secreţii ca pentamer; de pe LB are funcţie de receptor. Sînt primele Ig care apar în evoluţia filo- şi ontogenetică, cu importantă participare în reacţiile Ag—Ac.

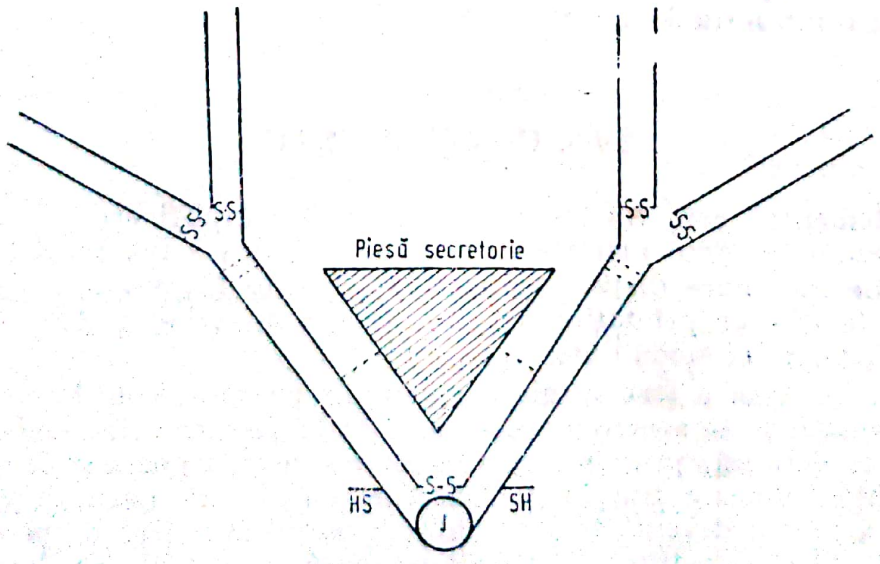


Fig. 2.20. Reprezentarea schematică a IgA secretorii.

Scanned with OKEN Scanner

4. *Ig D* au lanț H δ; în ser se detectează în cantitate foarte mică; au rol important de receptor și de control al maturării LB.

5. *Ig E*, denumite și reagine, cu lanț H caracteristic ε, au un plus de 100 aminoacizi față de alte clase. Se găsesc în cantitate foarte mică în ser, dar cresc rapid cantitativ în stările atopice, fiind prezente de asemenea în secreții. Sînt singurele Ig termolabile. Au citofilie pentru mastocite și bazofile, determinînd reacții de tip anafilactic (atopii).

b. *Subclase de Ig*. Determinanții specifici de pe Fc conturează subclasele de Ig; pentru IgG-4 subclase (γ_1, γ_2, γ_3, γ_4), în concentrații care cantitativ descresc de la γ_1 la γ_4 și cu unele funcțiuni distincte. În mod similar s-au descris la IgA subclasele α_1 și α_2 iar la IgM μ_1 și μ_2. Subclasa α_2 are o structură particulară, lanțurile L fiind legate între ele prin S—S, iar de fiecare lanț ușor se atașează un lanț H prin legături de hidrogen.

c. *Tipuri de Ig*. Determinanții antigenici ai lanțurilor L caracterizează două tipuri: lanțul L κ și lanțul Lλ. Într-o moleculă de Ig cele două lanțuri sînt identice (fie κ, fie λ). În felul acesta fiecare izotip are două forme, κ sau λ.

d. *Alotipuri*. Sînt definite de determinanți antigenici prezenți pe lanțul H sau L, distribuite inegal la subiecții din aceeași specie. Constituie deci markeri genetici individuali și se găsesc sub control alelic, cu transmitere mendeliană autozomală. Se datoresc unor modificări minore în secvențele de aminoacizi (chiar un singur aminoacid). Sistemul Gm este situat pe lanțurile H ale Ig, fiind format din 25 factori alotipici, iar sistemul Am (Am_1 și Am_2) pe lanțurile α_2. Sistemul Inv, cu trei determinanți antigenici, se găsește pe lanțul L de tip κ.

e. *Idiotip*. Fiecare Ig are specificitate pentru un determinant antigenic, conferind imunoglobulinelor heterogenitate de specificitate, dată de poziția de combinare. Prin structura sa în aminoacizi, diferită de la specificitate la specificitate, ea capătă caracter de determinant antigenic. Inoculînd anticorpii față de un antigen *(S. typhi)* izolați de la un animal A, la un alt animal identic genetic B, se formează la ultimul, anticorpi față de aceste imunoglobuline: anticorpi antiidiotip. Astfel de anticorpi antiidiotip apar în organism, față de Ig cu specificități variate, inclusiv față de receptorii pentru antigen de pe L.T. Se constituie astfel o rețea idiotip-antiidiotip, cu rol în reglarea răspunsului imun (teoria rețelei sistemului imun a lui J e r n e).

2.4.3. COMPLEMENTUL

Complementul este un sistem biologic de amplificare a răspunsului imun, prezent în serul mamiferelor, constituit din 9 fracțiuni (C_1—C_9) și 11 proteine globulare distincte, inactive (C_1 este format din C_{1q}, C_{1r} și C_{1s}). Unele din proprietățile lor sînt redate în tabelul 2.20. Activarea C se face prin două modalități:

1. **Calea clasică** a fost studiată mai mult pe complexe AgAc reprezentate de hematii și Ac specifici acestora. Cele 11 proteine sînt activate într-o ordine bine definită, prin interreacții ionice, reacții enzimatice și procese de adsorbție. Fiecare fracțiune constituie substratul natural pentru cea precedentă care a devenit activă, fiind la rîndul ei activator pentru etapa următoare. Unele fracțiuni ale C sînt scindate, prin activare, într-un frag-

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.20

Principalele proprietăţi ale proteinelor din sistemul C

Proteina	Greutate moleculară	Mobilitate electroforetică	Concentraţie serică µg/ml
C_{1q}	400.000	γ_2	180
C_{1r}	190.000	β_1	100
C_{1s}	85.000	α	80
C_2	115.000	β_1	25
C_3	180.000	β_2	1500
C_4	206.000	β_1	450
C_5	180.000	β_1	75
C_6	128.000	β_2	60
C_7	121.000	β_2	60
C_8	154.000	γ_1	80
C_9	80.000	α	150

ment care participă în continuare la procesul de activare şi altul care rămîne în faza lichidă, avînd unele activităţi biologice. Activarea fracţiunii sau complexului se notează cu o liniuţă deasupra simbolului (C_1^-). Iniţial pe suprafaţa hematiei se formează complexul AgAc, cu developarea receptorului pentru C, de pe Fc-ul unor Ig (IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgM), pe care se fixează C_{1q}, în poziţia S_1 de pe membrana celulară. C_{1q}^- acţionează asupra C_{1s}, care din proesterază, dobîndeşte funcţie de esterază; proteina C_{1r} joacă rolul unui intermediar între celelalte două proteine. C_{1q}, C_{1r} şi C_{1s} se leagă între ele prin legături necovalente, în prezenţa ionilor de calciu, realizînd complexul activat C_1^-. Urmează scindarea de către C_1^- a fracţiunilor C_4 şi C_2 în cîte două fragmente (C_{4a} C_{4b} C_{2a} C_{2b}). Fragmentul C_{4b} se ataşază de membrana celulară în poziţia S_2, de care se leagă apoi C_{2a}, în prezenţa ionilor de magneziu. Se realizează astfel enzima $C_{\overline{4b2a}}$ (C_3-convertaza clasică), cu acţiune de clivare a C_3 într-un fragment C_{3b} (important în ambele căi de activare a C) şi C_{3a}, eliberat în faza lichidă. Fragmentul C_{3b} se ataşează de membrana celulară în aceeaşi poziţie ca şi $C_{\overline{4b2a}}$, realizînd complexul $C_{\overline{4b2a3b}}$, o peptidază cu rol de C_5-convertază. Sub acţiunea acesteia are loc scindarea C_5 în fragmentul C_{5a} care trece în faza lichidă şi C_{5b} activ în continuare. Cu această etapă s-au încheiat reacţiile enzimatice, următoarele fiind procese de adsorbţie.

C_{5b} leagă C_6 şi C_7, realizînd un complex trimolecular ($C_{\overline{5b67}}$) şi apoi tetramolecular ($C_{\overline{5b678}}$), care se ataşază de membrana celulară în poziţia S_3 prin C_{5b}. Complexul tetramolecular are 6 poziţii de legătură pentru C_9, în acest fel formîndu-se complexul decamolecular $C_{\overline{5b6789}}$, cu care se încheie activarea clasică a sistemului (fig. 2.21 şi fig. 2.22).

2. **Calea alternativă (properdinică).** În 1954, Pillemer a descris un factor seric care combinat cu zimozanul (un polizaharid de perete al unor fungi) a produs activarea C', începînd cu C_3 şi pe care l-a denumit properdina. Ulterior s-a constatat că acest fenomen poate fi realizat şi de alţi activatori. Componentele necesare acestui proces de activare şi principalele proprietăţi sînt cuprinse în tabelul [2.21].

Se apreciază că, în prima etapă, are loc formarea unui complex reversibil între C_3 şi factorul B (proactivator). Acesta din urmă este activat de factorul D (proactivator-convertază), rezultînd un fragment mare Bb

Scanned with OKEN Scanner

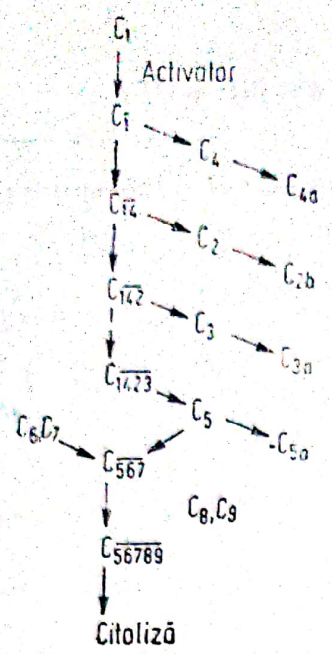


Fig. 2.21. Activarea C pe calea clasică.

activ și unul mai mic care se pierde în faza lichidă. Complexul C_3Bb este factorul inițial de scindare a C_3 în calea alternativă. Se formează în consecință C_{3b} care, dacă nu este protejat, va fi repede distrus de către $C_{3b}INA$ (C_3 inactivator). Unele substanțe cum sînt endotoxinele bacteriene, proteaze din țesuturi, enzime lizozomale eliberate din PMN, agregate de IgA și IgE, inulina (polizaharid din plante), zimozanul sînt activatori ai căii alternative. Acestea leagă C_{3b} la nivelul unei poziții denumită S. În con-

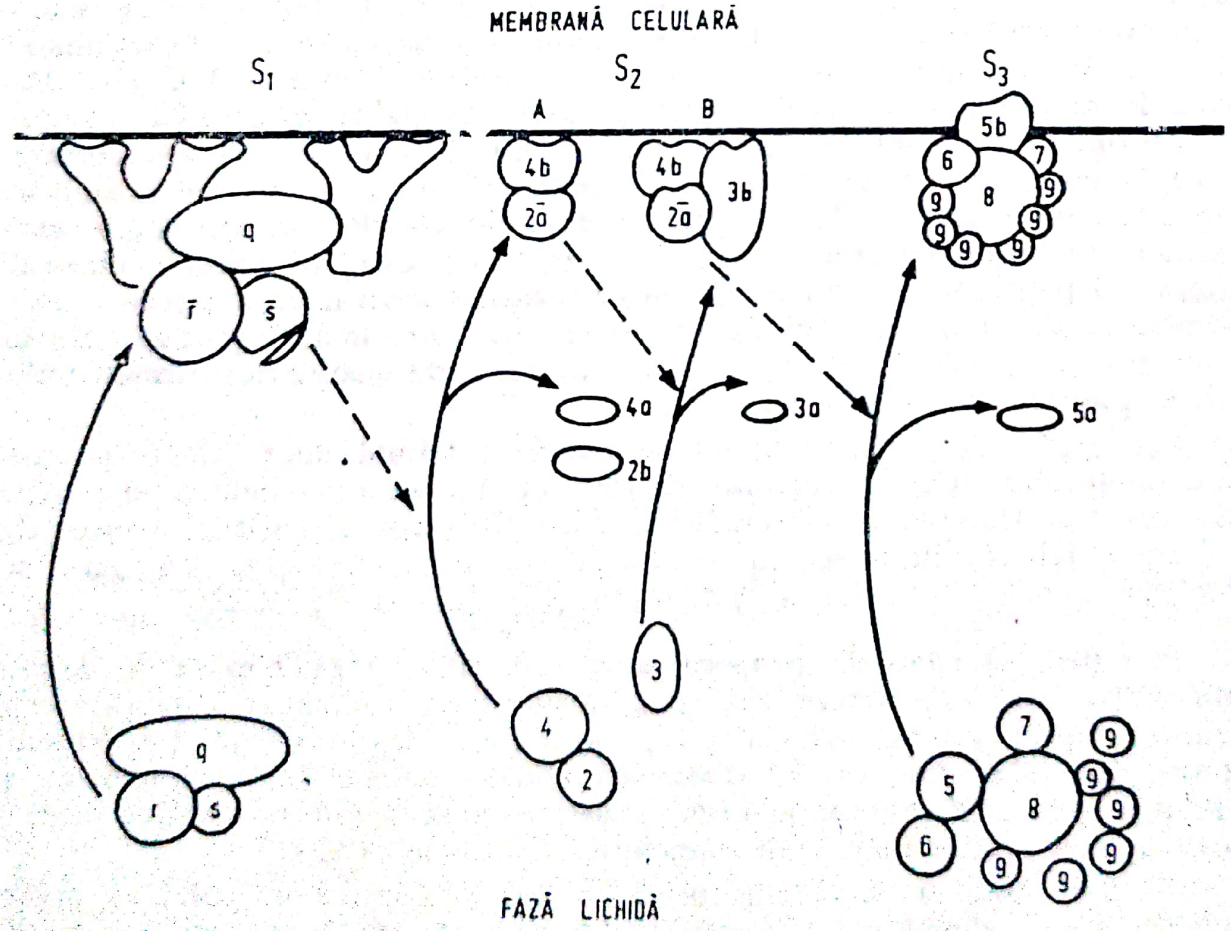


Fig. 2.22. Activarea C pe calea clasică (după Miescher, Müller-Eberhard).

Tabel 2.21

Principalele componente ale căii alternative

Componenta	Simbolul	Greutate moleculară	Mobilitate electroforetică	Sinonime
Properdina	P	184.000	γ	
Properdina activată	$\overline{P}$	184.000	γ	
Proactivator	B	93.000	β	Factor B, C_3 PA
Factor B activat	$\overline{B}$	63.000	γ	Bb
Proactivator — convertază	D	24.000	α	Factor D, C_3 PA-ză
C_3	C_3	180.000	β	Factor A, HSF
C_{3b}	C_{3b}	171.000	α_2	HSFa
Factor de inițiere	IF	170.000	β	
Factor nefritic	C_3 NeF	160.000	γ	
C_1 inhibitor	C_1 INH	90.000	α_2	
C_{3b} inactivator	C_{3b} INA	90.000	β	

tinuare de $S—C_{3b}$ se atașează factorul B, care la rîndul său este activat de factorul D. Factorul B activat ($\overline{Bb}$) împreună cu C_{3b} legat duc la formarea unei C_3/C_5-convertaze, dependentă de $\overline{C_{3b}(S—C_{3b}Bb)}$, cu acțiune de scindare a C_3 și C_5; ea este însă inactivată repede la 37°C (2 min.).

Pe de altă parte, $S—C_{3b}Bb$ poate activa properdina ($\overline{P}$). Acesta se leagă de $S—C_{3b}Bb$ și duce la formarea unei convertaze $C_3/C_5(S—C_{3b}PBb)$, mai stabilă (rezistă 8 minute la 37°C). De aici secvențele sînt similare celor din calea clasică, cu activarea și fixarea $C_5—C_9$ (fig. 2.23).

Unii autori apreciază că prima etapă din calea alternativă se datorește activării P de către un factor de inițiere (IF). În ultimii ani, s-a descris un activator endogen, evidențiat la bolnavii cu nefrită cronică hipocomplementemică (factorul nefritic-C_3NeF). Este o Ig care se leagă de C_3-convertază și formează C_{3b}BbNeF. Ca urmare complexul devine mai stabil, ducînd în continuare la activare.

Semnificația biologică a căii alternative constă, mai ales, în faptul că astfel se realizează activarea C′ prin produse microbiene, mai timpuriu, înainte de formarea Ig specifice, sau în lipsa acestora. În realitate, se pare că cele două modalități de activare acționează *in vivo* în cooperare, deoarece blocarea experimentală selectivă a căii clasice a dus la scăderea semnificativă a ratei de scindare a C_3 prin activatorii căii alternative. Pe de altă parte este de remarcat rolul C_3-convertazei clasice (C_{4b2a}) în activarea C_3 și deci, a producerii de C_{3b} care deține un rol important în calea alternativă.

Activarea C′ și, în consecință, multitudinea de funcții biologice pe care le realizează întregul sistem, complexele sau fragmentele ce rezultă sînt dependente de un sistem biologic de control, care reglează aceste procese.

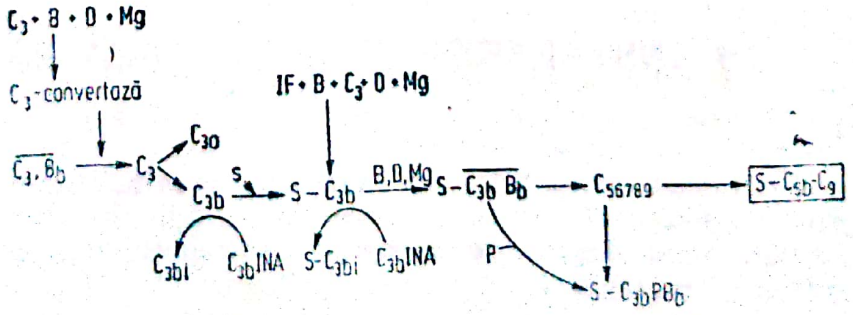


Fig. 2.23. Calea alternativă de activare a C.

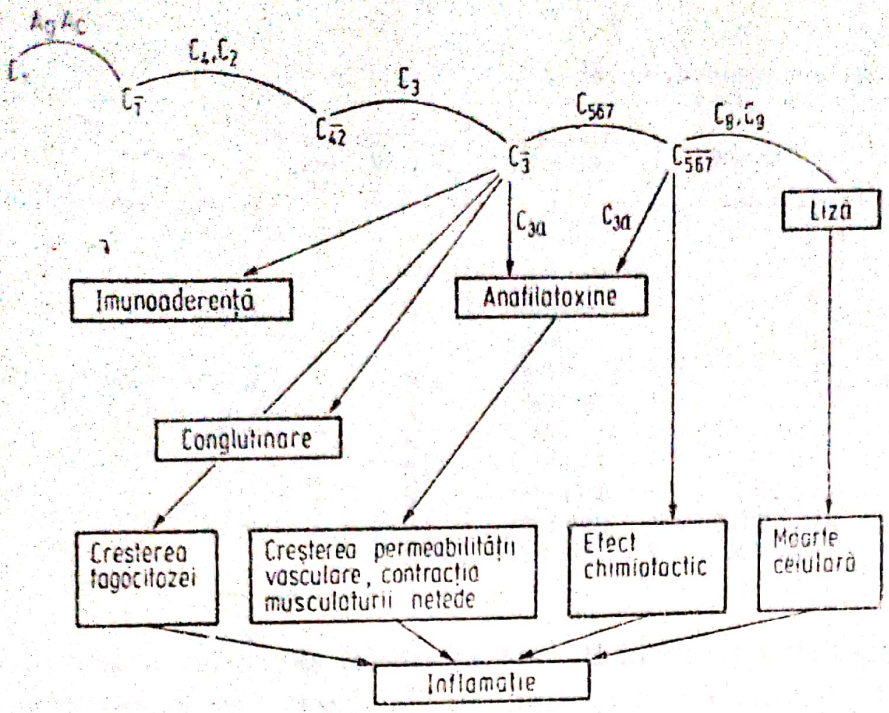


Fig. 2.24. Efecte biologice ale activării sistemului C.

Altfel, activarea s-ar produce permanent, pînă la epuizarea în totalitate a sistemului, indiscutabil cu efecte nefavorabile. Cele mai importante mecanisme sînt: 1) desprinderea C_{4b2a} de pe membrana celulară şi deci, blocarea în continuare a activării C_3; 2) existenţa C_1^- INH (inhibitorul C_1^-), prezent în ser, care inhibă poziţiile active de pe C_{1r} şi C_{1s}; 3) acţiunea C_{3b} INA, enzimă de asemeni prezentă în serul normal, care transformă C_{3b} în C_{3bi} (inactiv); 4) degradarea rapidă (cîteva minute) a C_3/C_5-convertazelor ($S-C_{3b}Bb$; $S-C_{3b}PBb$) la 37°C.

Primele modificări ultrastructurale, sub forma unor orificii superficiale (vizualizate prin microscopie electronică), apar la nivelul membranei celulare după fixarea C_{5b}. Ele devin leziuni funcţionale numai după încheierea întregului proces de activare (ataşarea C_9). Este probabil că, în membrana celulară se creează nişte canale hidrofile care permit schimburi libere de apă între celulă şi mediul extern.

Activarea se asociază cu următoarele reacţii AgAc la care participă C′:

1. reacţii de citotoxicitate (hemoliză, bacterioliză, efect bactericid, efect citotoxic asupra celulelor nucleate de mamifere), reacţii de fixare a C, în care intervine întregul sistem;
2. reacţii AgAc ce au loc prin fixarea C_{3b} (opsonizare, imunoaderenţă, conglutinare).

Unii produşi rezultaţi din activarea C au funcţii biologice importante (anafilatoxină, chemotactism, amplificarea neutralizării virale), cu semnificaţie în controlul procesului inflamator (fig. 2.24).

2.5. INSTALAREA ŞI MODELAREA RĂSPUNSULUI IMUN

Prin capacitatea S.I. de a reacţiona specific cu antigenul şi de a se angaja în răspunsul imun, se realizează una din funcţiile principale ale apărării imunologice: *recunoaşterea şi reacţia faţă de substanţele străine pătrunse în ţesuturi.*

Scanned with OKEN Scanner

Răspunsul imun este un proces de mare complexitate, instalarea lui și reacția imună consecutivă, fiind modulate de o rețea diversificată de factori tisulari, celulari și mediatori biologici, angajați de antigen prin proprietățile sale și modalitatea de pătrundere în organism.

2.5.1. PARTICIPAREA LIMFOCITELOR ÎN RĂSPUNSUL IMUN

Angajarea limfocitelor în răspunsul imun este dictată de o condiție principală: reacția lor cu Ag. specific, avînd ca rezultat o activare (expansiune clonală) sau cu alți liganzi (de exemplu, mitogeni nespecifici), rezultînd o activare policlonală. Această condiție se realizează prin interacțiunea ligandului cu receptori specifici, plasați aleator în membrana celulară. Evenimentele ce se declanșează în urma fixării antigenului pe celulă sînt mai bine cunoscute la L.B., la care se știe că receptorii sînt imunoglobuline structurate în mozaicul fluid al membranei citoplasmatice. În urma formării complexelor Ag.—Ac. pe suprafața celulară are loc o mobilizare a receptorilor în fluidul membranei, cu formarea la început de aglomerări (pete, așa cum se văd în tehnica imunofluorescenței) și apoi acumularea lor la un pol al celulei sub formă de beretă (cap), cu endocitare ulterioară. Aceste procese de suprafață celulară au drept consecință modificări biochimice profunde: mărirea permeabilității celulare, activarea ATP-azei, creșterea influxului de Ca^{++}, a nivelului celular de cAMP și cGMP, sinteză activă de fosfolipide, augmentarea sintezei de ARN, proteine și în final a ADN-ului. Au loc apoi, transformarea L în celulă mare blastică și diviziuni succesive. Cu toate că receptorii LT sînt mai puțin cunoscuți, fiind probabil constituiți din produși ai C.M.H. și porțiuni variabile de Ig, desfășurarea evenimentelor pe suprafață este similară și rezultatul același: transformare blastică și proliferare care poate fi indusă și de mitogeni policlonali, ca PHA (fitohemaglutinină) și concanavalină A (Con. A); ea servește ca un test *in vitro* pentru aprecierea stării funcționale (capacității de răspuns imun) a acestei linii celulare. Totodată, în mediul în care are loc stimularea, se eliberează produși solubili biologic activi, cu proprietăți variate.

I. **De la LB la plasmocit și sistem imunoglobulinic** (imunitate umorală). În dezvoltarea ontogenetică a LB, cîștigarea imunocompetenței este asociată cu prezența pe suprafața celulară a Ig M monomerice și Ig D, existînd pe celulă aproximativ 10^5 molecule receptor pentru un antigen. În plus, în membrana celulară apar și alți receptori cu funcție încă neprecizată: receptori pentru Fc-ul IgG, pentru C_{3b} și C_{4b}, receptori pentru mitogeni nespecifici, și, în plus, antigenul caracteristic LHBA (la om). În urma interacțiunii cu antigenul, LB devine angajat, suferă transformare blastică și, prin cîteva diviziuni, trece prin stadiul limfoblast-proplasmocit și se diferențiază în *plasmocit,* capul final al acestei linii. Plasmocitul are o structură care asigură o sinteză activă de proteine. Cu toate că întreaga linie de la LB mic la plasmocit sintetizează și secretă Ig, plasmocitul este prin cantitatea secretată, *principala celulă producătoare de imunoglobuline* (pînă la 2000 molecule pe secundă).

Față de puține antigene (timoindependente) ca flagelina polimerizată, antigenul O, polizaharid pneumococic, polivinilpirolidonul, angajarea LB se face fără intervenția LT și macrofagului, iar IG sintetizate în aceste

condiții aparțin clasei IgM. În cursul diviziunilor blastice a LB angajat, unele din limfoblaste (diviziune asimetrică) revin la aspectul de LB mic, care are o viață lungă și constituie celula cu memorie, direcționată, în special, față de determinanți haptenici.

Angajarea LB este însoțită de un răspuns proliferativ cu modificări caracteristice în organele limfoide, care duc la formarea centrilor germinativi. Totodată are loc și o diversificare în morfologia celulară, consecință a transformării blastice și proliferatorii. Astfel, în urma administrării i.v. a hematiilor de oaie (HO) la șoarece se constată că, dacă înainte de imunizare 90% din LB sînt limfocite mici, după imunizare apar L de mărimi și aspect variat (tab. 2.22).

Tabel 2.22

Modificări morfologice consecutive stimulării antigenice într-un ganglion limfatic

Înainte de imunizare	Limfocite mici	90%
În urma stimulului antigenic	Limfocite mici	14%
	Limfocite mijlocii (8—11 μm)	30%
	Limfocite mari (12 μm)	20%
	Limfoblaști și celule mari pironinofile	31%
	Plasmocite	5%

Un plasmocit sau oricare din celulele seriei LB-plasmocit produce un set de Ig identice, care aparțin unei singure clase, subclase, aceluiași tip (lanț Lk și Lλ), alotip și idiotip și au aceeași afinitate pentru antigen. Pentru aceasta, în urma stimulului antigenic, au loc o serie de procese genetice. Așa cum s-a văzut, receptorii de suprafață sînt IgM monomerice și IgD. Se produce o comutare genetică (switch), în urma căreia, în sinteza proteică, se exprimă genele pentru porțiunea C_H a unei clase de Ig—IgM, IgG, IgA sau IgE. Totodată intervine procesul de excludere alelică, transcriindu-se informația numai din genele unui cromozom. Mecanismele prin care are loc această restricție genetică sînt încă insuficient precizate.

Din cele de mai sus rezultă că *heterogenității imunoglobulinelor* (clasă, subclasă, tip etc.), îi corespunde o *heterogenitate celulară.*

Sinteza intracelulară a Ig. Fiecare lanț polipeptidic H și L este codificat de două gene, una pentru porțiunea C și cealaltă pentru porțiunea V, ceea ce particularizează sinteza Ig față de alte proteine. Unirea funcțională a celor două gene are loc în ADN, de aceea informația pentru lanțul H și lanțul L este transcrisă în cîte o moleculă de ARNm. Sinteza polipeptidelor se face pe polizomi distincți (300 S pentru H și 200 S pentru lanțul L). Sinteza unui lanț H durează 60 s, iar a celui L, 30 s. Lanțurile L și H sînt asamblate în modalități variate în raport de clasă și subclasă: $H + H = H_2 \rightarrow H_2 + L = H_2L \rightarrow H_2L + L = H_2L_2$; sau $H + L = HL \rightarrow HL + HL = H_2L_2$. De la sinteza lanțurilor de polipeptide pe ribozomi, pînă la eliberarea moleculei de Ig din celulă, sînt necesare cel puțin 20′. În acest interval moleculele ajung prin cisternele ergastoplasmice în aparatul lui Golgi, de unde sînt transportate prin vezicule în membrană și secretate. În timpul acestui transport intracelular, componenta carbohidratică din Ig se atașează, prin mai multe trepte enzimatice.

Ig polimerice (de exemplu, IgM) sînt secretate de celulă sub formă pentamerică (19 S), dar se găsesc în celulă ca monomeri. Se consideră

Scanned with OKEN Scanner

că puțin înaintea eliberării din celulă, prin reacție enzimatică, are loc formarea punților disulfurice și apoi, atașarea piesei J. IgA secretorie are o situație particulară. Ea este secretată din plasmocit ca un dimer (11 S) cu piesa J, iar la trecerea prin celula epitelială a mucoasei, se atașează piesa secretorie, care este sintetizată de aceasta.

II. **Limfocitele T și imunitatea mediată celular (I.M.C.).**

În dezvoltarea cunoștințelor privind I.M.C., ca momente de referință sînt considerate fenomenul lui K o c h (1891) și reacția de hipersensibilitate tardivă (H.T.) desprinsă din fenomenul de alergie de către Z i n s s e r (1925).

În fenomenul lui K o c h, reinocularea b. tuberculos la un cobai cu infecție tuberculoasă are ca rezultat apariția la locul de inoculare a unei necroze uscate, cu eliminarea rapidă a țesuturilor alterate: imunitate față de reinfecție sau premuniție.

H.T. sau de *tip tuberculinic* constă într-o reacție inflamatorie la locul de inoculare al tuberculinei sau P.P.D., care apare cu intensitate maximă la 24—48 h., la un subiect care are imunitate față de b. tuberculos prin infecție, sau prin vaccinare cu B.C.G. S-a descris și o variantă a H.T., *reacția cutanată cu bazofile* (J o n e s și M o t t e), care apare la om și la cobai, ca răspuns față de mai multe antigene, de obicei haptene, aplicate percutan. Prin cuplare cu proteinele din piele, mai ales în cazul antigenelor reprezentate de substanțe chimice, ca de exemplu, clorura de trinitrofenil, are loc un răspuns imun cu angajarea L.T. La un contact cutanat ulterior cu antigenul se declanșează o reacție inflamatorie în care se găsește o acumulare de bazofile și/sau mastocite.

I.M.C. și H.T. nu pot fi transferate prin ser imun, ci așa cum s-a văzut, prin limfocite sau printr-o limfokină, factorul de transfer. S-a conturat astfel o categorie aparte de procese imunitare, în care intervine L.T. prin subpopulațiile sale, sau prin produșii solubili ai acestora. În plus, s-a definit rolul important al unor subpopulații ale L.T. în reglarea imună.

Prin interacțiunea antigenului cu receptorii specifici sau prin efectul mitogenilor nespecifici (fitohemaglutinină PHA, Con A, ser antilimfocitar), L.T. este angajat, se transformă blastic și proliferează, punînd în joc mai multe subpopulații cu funcții diferite, rezultînd manifestări imune complexe.

Se poate aprecia că LT, prin imunitatea celulară, are rol în:

1. apărarea față de infecții bacteriene, virale și parazitare (tabelul 2.23.);

Tabel 2.23

Principalele microorganisme* inductoare de I.M.C.

Bacterii	Fungi	Protozoare	Virusuri
Mycobacterium Salmonella Brucella Listeria Treponema Rickettsia	Candida Cryptococcus Histoplasma	Toxoplasma Plasmodium malariae Leishmania Trypanosoma	Toate

* Toate sînt parazite celulare facultative sau obligate.

Scanned with OKEN Scanner

2. supravegherea imună pentru îndepărtarea celulelor îmbătrînite şi mutante, inclusiv a celor tumorale;
3. reacţiile de respingere a transplantelor şi grefelor;
4. apariţia unor boli imune.

Pentru a realiza această diversitate de funcţii, LT intervine printr-o diferenţiere în mai multe subpopulaţii din care în prezent sînt mai bine cunoscute următoarele:

L.T. citotoxice care acţionează asupra celulelor ţintă, faţă de ale căror antigene au fost sensibilizate (angajate), distrugîndu-le. Fenomenul de citotoxicitate se desfăşoară deci în două etape: recunoaşterea specifică a antigenelor celulare şi apoi citoliza, fie prin contact direct intercelular, fie prin eliberarea unui factor toxic (limfotoxină). Această subpopulaţie are o intervenţie majoră în îndepărtarea celulelor străine (respingerea transplantelor) sau a celulelor proprii modificate antigenic, a celulelor tumorale, a celulelor infectate cu virus etc.

L.T. producătoare de limfokine. Acestea reprezintă un set mare de produşi solubili, cu proprietăţi şi funcţii variate. Unele din aceste limfokine au rol important în declanşarea reacţiilor de H.T. şi a inflamaţiei imune. Apoi, o categorie importantă acţionează asupra macrofagului pe care, prin cooperare celulară, îl angajează în I.M.C.

L.T. cu memorie. Prin angajarea sa în răspunsul imun, LT transformat blastic revine la aspectul caracteristic de L.T. mic, devenind celula principală cu memorie, direcţionată, mai ales, faţă de determinanţii antigenici de pe purtător, cu intervenţie importantă în răspunsul secundar.

Subpopulaţii de LT cu rol în reglarea imună. În stadiul actual al cunoştinţelor nu este posibil să se definească precis mecanismele prin care L.T. induc exprimarea unor manifestări imune atît de complexe, nici modalităţile prin care sînt activate diferite subpopulaţii prin stimularea antigenică. Se schiţează apoi relaţii cu alte sisteme biologice, cum sînt celulele endoteliale, mastocitele, sistemul de coagulare, cel fibrinolitic, a căror modalităţi de antrenare şi activare rămîn să fie precizate în viitor.

Multă vreme I.M.C. şi H.T. au fost privite ca fiind determinate de procese similare, dacă nu identice. Este posibil să apreciem, că cele două procese se disociază şi că ele sînt probabil induse de determinanţi antigenici diferiţi.

2.5.2. MODULAREA RĂSPUNSULUI IMUN PRIN COOPERARE CELULARĂ

Disocierea analitică în cele două tipuri de imunitate, cu participarea activă a L.T. şi L.B., a avut un rol pozitiv în cunoaşterea proceselor imune. La o înţelegere a variaţiilor individuale ca răspuns imun, cu efect favorabil sau imunopatologic şi al manifestărilor variate în raport de proprietăţile antigenului, nu se poate ajunge decît printr-o integrare funcţională a celulelor răspunsului imun şi a celulelor accesorii, printr-o strînsă cooperare (fig. 2.25). Aceasta a constituit de altfel, o cale de progres real în imunologia modernă.

Scanned with OKEN Scanner

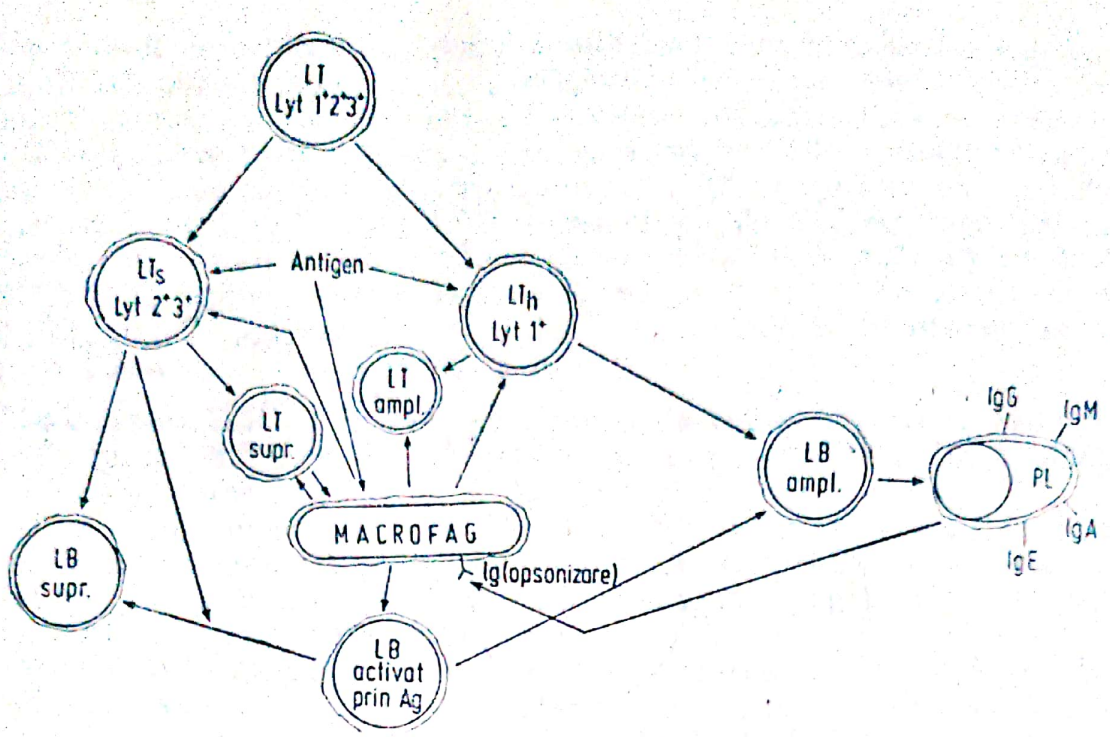


Fig. 2.25. Modularea răspunsului imun prin cooperare celulară.

Cooperarea S.M.F. (sistem mononuclear fagocitar) cu LT şi LB. Prin funcţia sa fagocitară, macrofagul (Mf) captează şi prelucrează antigenul, fixînd grupările determinante pe suprafaţa sa şi prezentîndu-le fie L.T. fie L.B. Rolul Mf în prezentarea antigenului a reieşit iniţial din observaţia că în cursul imunizării, în ţesuturile limfoide, în jurul unui Mf se formează o coroană de limfocite, cu interrelaţii evidente între cele două tipuri de celule: fenomenul de prezentare a antigenului. De asemenea, în testări *in vitro* s-a constatat că eliminarea Mf din sistemul celular duce la abolirea formării anticorpilor. În felul acesta şi pe baza altor date experimentale, s-a stabilit o cooperare între L.B. şi Mf. Relaţia Mf—L.T. este importantă în activarea L.T. ajutător, L.T. citotoxic şi L.T. producător de limfokine, cu rol cert al antigenelor de histocompatibilitate în această cooperare. Astfel la şoarece, LT recunoaşte antigenul de pe suprafaţa Mf prin asocierea cu un antigen Ia (antigen asociat cu regiunea I din CMH, în care se găsesc genele Ir (fig. 2.26). Multe experienţe sugerează că evitarea intervenţiei Mf în prelucrarea antigenului favorizează intervenţia LT_s. În afară de cooperarea prin contact intercelular, Mf activat produce factori solubili (monokine) cu funcţii diferite. Astfel, monokina numită *factorul înrudit genetic,* activează L.B. şi L.T.; alte monokine au fie funcţie reglatoare de stimulare, fie de inhibare a angajării L în răspunsul imun. În afară de aceasta, Mf are rol de tampon, depozitînd antigenul şi prezentîndu-l în cantităţi adecvate angajării lor. Prin eliminarea acestei funcţii a Mf se poate instala toleranţa imunitară.

L.T. antrenează Mf pentru a participa în realizarea IMC, printr-un proces de „activare". B. tuberculos fagocitat de Mf provenit de la un animal neimun persistă şi se multiplică intracelular. În urma imunizării, L.T., printr-o limfokină probabil din grupul MIF, declanşează o serie de evenimente structurale, inclusiv transformarea blastică, cu prezenţa unui număr mare de lizozomi. Mf devine foarte activ metabolic, cu capacitate crescută de fagocitare şi un conţinut bogat în substanţe anti-

Scanned with OKEN Scanner

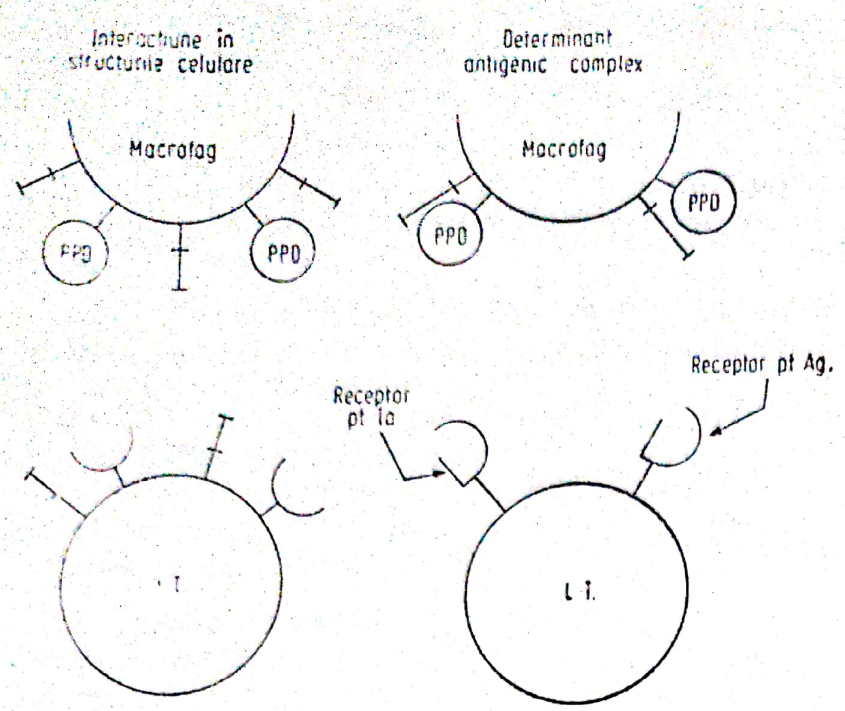


Fig. 2.26. **Cooperare între macrofag și L.T. cu necesitatea intervenției antigenelor a.**

Receptorii de pe L.T. recunosc asocierea antigenului străin (PPD) cu antigenul Ia prezent pe macrofag.

microbiene. El este astfel capabil să oprească multiplicarea și chiar să omoare microorganismul fagocitat. Instalarea stării de macrofag activat este indusă specific de antigen (b. tbc), dar după aceea, activitatea sa are un efect nespecific, acționînd și asupra altor bacterii cu multiplicare facultativă intracelulară *(Listeria, Brucella* etc.). El capătă și capacitatea de a distruge celulele țintă, inclusiv celule tumorale. Astfel se explică imunostimularea prin BCG sau *Corynebacterium parvum,* ca mijloc de terapie antitumorală.

Așa cum se știe IgG și IgM, prin citofilia lor, se fixează pe suprafața celulei și favorizează procesul de fagocitoză (cooperare LB—Mf).

Cooperarea L.T.—L.B. S-a văzut că pentru multe antigene (antigene timodependente) sinteza anticorpilor are loc *in vitro* numai dacă există în amestec L.T. și L.B. (v. tabelul 2.24). Pentru antigenele T-independente, sinteza anticorpilor are loc fără participarea L.T., dar anticorpii formați aparțin numai clasei IgM. Datele experimentale au stabilit că în această cooperare L.T. are o funcție reglatoare, intervenind prin două

Tabel 2.24

Necesitatea cooperării LT și LB în producerea de Ig față de hematii de oaie

Lotul de animale (șoareci)	Proveniența celulelor transferate	Răspunsul în anticorpi anti HO
I.	Măduva normală	±
II.	Timus de la animal normal sau imunizat	−
III.	Amestec de celule din timus și măduvă	+ + +
IV.	Splină de la animal neimunizat	+ + +
V.	Splină de la animal imun	+ + + +

Loturile de animale au fost iradiate și apoi li s-au transferat celulele indicate la fiecare lot, de la animale singenice normale sau imunizate. După aceea s-au inoculat hematii de oaie și s-a urmărit sinteza anticorpilor în splină.

Scanned with OKEN Scanner

subpopulații de celule: L.T_h (helper, ajutător), care favorizează angajarea L.B. în răspunsul imun și L.T_s (supresor) care are efect de supresie, diminuînd sau abolind instalarea imunității umorale. L.T_h se caracterizează la șoarece prin antigenele Lyt 1, la om ca L.T cu receptori pentru IgM, iar L.T_s la șoarece prin antigenul Lyt 2,3 pe cînd la om ca LT cu receptori pentru IgG. Cele două subpopulații de L.T reglează atît amploarea răspunsului umoral, cît și sinteza claselor și subclaselor de Ig, față de antigenele T-dependente și T-independente, acumulîndu-se dovezi că există subseturi distincte de celule helper și supresoare pentru reglarea fiecărei clase sau subclase de Ig.

Cooperarea L.T.—L.T. Prin subpopulațiile reglatoare este modulată și funcția subpopulațiilor de LT citotoxice și producătoare de limfokine și astfel, instalarea I.M.C.

O mențiune aparte trebuie făcută pentru intervenția L.T_s în instalarea și menținerea toleranței imunitare. De asemenea este foarte probabil că dereglări în activitatea subpopulațiilor reglatoare să aibă o contribuție esențială în imunopatologie.

Mecanismele prin care se realizează cooperarea celulară a L sînt încă insuficient cunoscute și caracterizate. Într-un prim model propus de M i t c h i s o n, pentru relația L.T.—L.B. (fig. 2.27), L.T. prin receptorii săi captează antigenul, de obicei prin determinanți situați pe purtător și prezintă determinanții haptenici L.B. Deși considerat în prezent simplist, acest model are două contribuții importante: 1. subliniază necesitatea contactului intercelular; 2. scoate în evidență rolul L.T. ca principală celulă recirculantă, care prin această proprietate întîlnește și captează antigenul, transportîndu-l în zonele în care este situat LB necirculant.

În interacțiunile celulare s-a dovedit că, pe lîngă contactul intercelular, intervin și corelații genetice între celule. Aceasta a reieșit din datele privind acțiunea L.T. citotoxic asupra celulei modificate antigenic, datorită infecției cu un virus: efectul killer se exercită numai asupra celulelor țintă (infectate) care posedă antigene identice de histocompatibilitate cu L.T. citotoxic (celule singenice). Prin mecanisme genetice variate, este indiscutabilă participarea în relațiile de cooperare între L, atît a recunoașterii antigenului, cît și a participării unor produși (antigene) ale C.M.H., mai ales a antigenelor Ia la șoarece și a antigenelor Dr la om.

În felul acesta, în definirea interacțiunilor celulare, ca moment important în activarea și angajarea celulelor limfoide pentru realizarea

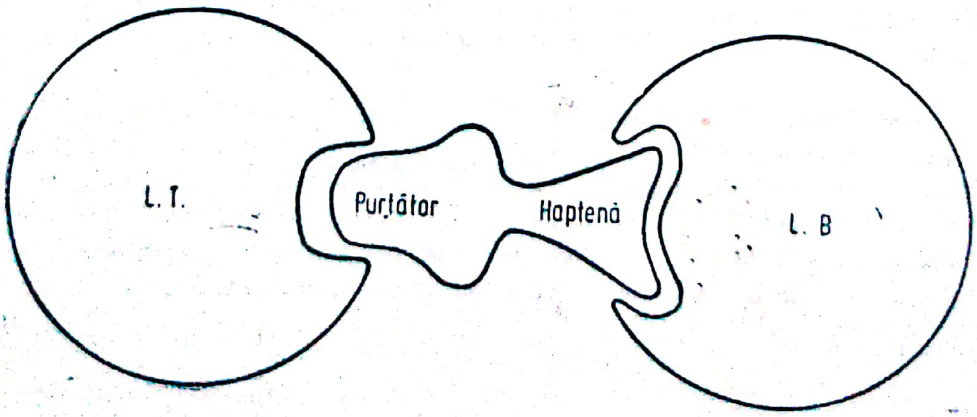


Fig. 2.27. **Cooperare între L.T. și L.B.** (model propus de Mitchison).

răspunsului imun, se readuce în discuție modelul celor „două semnale". Un semnal este generat de interacțiunea între un determinant de pe antigen și un receptor de pe L sensibil la antigen. Al doilea semnal este eliberat de celula reglatoare. În aceste relații de semnalizare un rol important îl au proteinele transmembranale, cAMP, cGMP, influxul de Ca^{++}, etc.

În ultimii ani s-a văzut că în modularea răspunsului imun intervin, alături de contactul intercelular, și mediatori solubili izolați și purificați din lichidul culturilor de L.T. angajate clonal prin antigen sau policlonal prin mitogeni. Unii dintre acești mediatori au funcții ajutătoare, alții de supresie a răspunsului imun. Ei sînt încadrați între limfokine și sînt eliberați preponderent de L.T. (cu excepția monokinelor).

Factorii solubili pot fi antigen specifici, dar foarte mulți din cei cunoscuți sînt antigen nespecifici (rezultatul activării policlonale) și majoritatea din cei cunoscuți pînă acum angajează L.B. și producerea de Ig. Poate mai important pentru perspective terapeutice este faptul că unii mediatori reglează amplificator sau supresor o anumită clasă de Ig (de exemplu, IgG sau IgE).

2.5.3. MODULAREA RĂSPUNSULUI IMUN PRIN ANTIGEN

Răspunsul imun și reacțiile imunitare sînt influențate calitativ și cantitativ de proprietățile antigenului și modalitățile în care este prezentat suprafețelor sistemului limfoid. Pentru o mai bună înțelegere a acestui fenomen sînt utile cîteva informații privind *toleranța imunitară,* definită astfel: o stare funcțională a S.I. față de un antigen sau determinant antigenic, manifestată prin absența sau diminuarea capacității de răspuns imun de I.U., IMC sau ambele.

Așa cum se știe în cursul dezvoltării și diferențierii ontogenetice a L, structurile proprii sînt recunoscute ca self și față de ele nu se declanșează răspuns imun (toleranță naturală). Dacă în perioada perinatală se introduc diverse antigene la animale, față de acestea se instalează toleranță, dar așa cum se va vedea, fenomenul este ca și răspunsul imun, în mare măsură dependent de antigen. Caracterul cel mai important al toleranței este specificitatea sa de antigen, ceea ce o deosebește de imunosupresie, în care este diminuată totalitatea reacțiilor imune. Toleranța imunitară este obținută prin acțiunea mai multor tipuri de factori (tabelul 2.25). Ea se utilizează în terapia bolilor autoimune și în chirurgia de transplant.

Tabel 2.25

Factori imunosupresori

Factori fizici	Factori biologici	Compuși chimici
Iradiere cu raze X	Ser antilimfocitar Corticosteroizi	Tiopurine (azatiopriu, 6-mercaptopurina) Agenți alchilanți (ciclofosfamida, clorambucil)

Scanned with OKEN Scanner

I. **Proprietăţile antigenului.** Starea fizică a antigenului poate fi: particulată (celule heterogene sau allogene, bacterii, virioni etc.), sau solubilă. Această proprietate are o mare importanţă. Astfel antigenele particulate sînt fagocitate rapid şi dacă pătrund în circulaţia generală, dispar în cîteva ore. Ele sînt bune imunogene. Proteinele serice heterologe pot persista în organism mai multe zile şi ele sînt eficient eliminate numai după formarea anticorpilor. Faţă de antigenele solubile în condiţii obişnuite de imunizare se obţine mai ales I.U. şi sînt mai bune imunogene cînd se găsesc ca agregate moleculare. Dacă se îndepărtează agregatele dintr-o soluţie de proteine (de exemplu, Ig) prin ultracentrifugare, preparatul obţinut favorizează instalarea toleranţei.

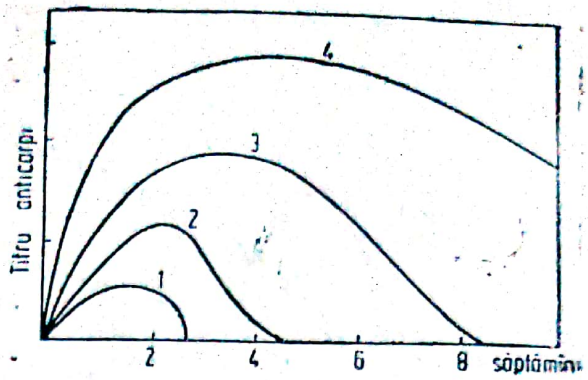


Fig. 2.28. Efectul adjuvanţilor asupra titrului de anticorpi folosind ca antigen ovalbumina (OV):
1 — OV solubilă; 2 — OV precipitată; 3 — adjuvant incomplet Freund; 4 — adjuvant complet Freund.

Includerea unui antigen particulat şi mai ales solubil într-un adjuvant, îi măreşte imunogenicitatea (fig. 2.28). Adjuvantele sînt deci, substanţe care, asociate unui antigen, potenţează imunogenicitatea acestuia. Cele mai importante adjuvante utilizate experimental sau în vaccinare sînt redate în tabelul 2.26.

Tabel 2.26

Principalii adjuvanţi utilizaţi experimental sau în vaccinuri

Grupe	Tipuri	Utilizare
Adjuvante uleioase	Adjuvantul complet Freund (ACF)	Experimental
	Adjuvantul incomplet Freund (AIF)	Experimental
	Adjuvant 65*	Vaccinare antigripală
Săruri minerale adjuvante	Fosfat de aluminiu	Vaccinare
	Hidroxid de aluminiu	Vaccinare
	Alginat de calciu	Experimental
	Sulfat de beriliu	Experimental

* Emulsie de apă în ulei, conţinînd monostearat de aluminiu

Un adjuvant complet Freund (ACF) se prepară din substanţe uleioase: o emulsie cu apă obţinută din ulei de parafină, lanolină şi celule moarte dintr-o cultură de *Mycobacterium tuberculosis,* în care se înglobează antigenul. Dacă din ACF se elimină celulele de *Mycobacterium,* se obţine adjuvant incomplet Freund (AIF). Înglobarea antigenelor în ACF favorizează puternic instalarea I.M.C., aceasta devenind posibilă şi pentru antigene solubile. Acelaşi antigen, în ACF induce H.T., pe cînd în AIF, duce la instalarea hipersensibilităţii cu bazofile.

Proprietăţile antigenului influenţează şi metabolizarea lui în organism. Acele antigene care sînt greu metabolizabile (ca de exemplu, polizaharidul pneumococic), sau antigene sintetizate din D-aminoacizi, induc tole-

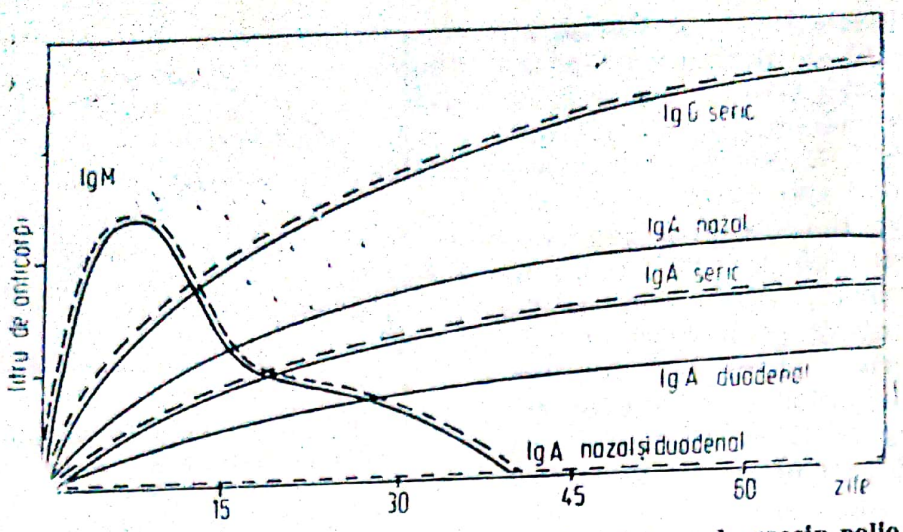


Fig. 2.29. Răspuns diferit în IgA_s — la administrare de vaccin polio cu virus omorît prin formaldehidă şi cu virus viu cu virulenţa atenuată.

Nu apar diferenţe la cele două vaccinuri în clase de Ig, cu excepţia IgA_s —, care lipseşte după vaccinare cu virus omorît din secreţia nazală şi duodenală. ——— = vaccin cu virus polio omorît; — — — = virus viu atenuat.

ranţa imunitară. O haptenă care declanşează reacţie de hipersensibilitate imediată de tip I (citotrop), dacă este cuplată la un purtător reprezentat de alcool polivinilic sau de polietilenglicol, are efect imunosupresor asupra sintezei de IgE.

Pe un alt plan reacţia imună este influenţată de starea unui antigen microbian. De exemplu: vaccinarea în poliomielită se face cu vaccin cu virus viu cu virulenţa diminuată prin administrare per os, sau cu vaccin cu virus omorît prin tratare cu formol, prin inoculare parentarală. După cum se vede în figura 2.29, diferenţa principală constă în faptul că virusul viu se replică în organismul vaccinat şi antrenează şi sistemul imunitar local din mucoasa intestinală şi faringiană cu formarea de IgA secretorii. Acestea sînt complet absente prin vaccinarea cu virusul omorît.

II. **Modalităţi de prezentare a antigenului:** a. *Răspuns primar-răspuns secundar.* Instalarea şi dezvoltarea imunităţii sînt influenţate de următorul fapt: dacă Ag ajunge pentru prima oară sau de repetate ori, în contact cu celulele limfoide ale unui organism, se instalează în consecinţă unul dintre cele două tipuri de răspuns sau hiperimunizare. În aprecierea răspunsului primar trebuie avută însă în vedere existenţa anticorpilor naturali care se găsesc în organism faţă de multe imunogene, datorită, înrudirilor antigenice. Există de asemenea diferenţe în desfăşurarea instalării imunităţii dependente de proprietăţile şi calităţile imunogenului.

Trecînd peste aceasta, *răspunsul primar* are următoarele caracteristici (fig. 2.30): după inocularea antigenului urmează o *perioadă de latenţă* de 4—8 zile, uneori pînă la două săptămîni în care nu se pot evidenţia anticorpi; se instalează apoi *perioada de creştere* treptată a cantităţii imunglobulinelor, nivelul maxim al acestora, în general nu prea ridicat, fiind înregistrat într-un interval de 9—15 zile; cantitatea anticorpilor se menţine un timp foarte scurt nemodificată — *perioada staţionară,* după care scade rapid pînă la valori foarte joase. În acest tip de răspuns, IgM apar primele şi predomină cantitativ.

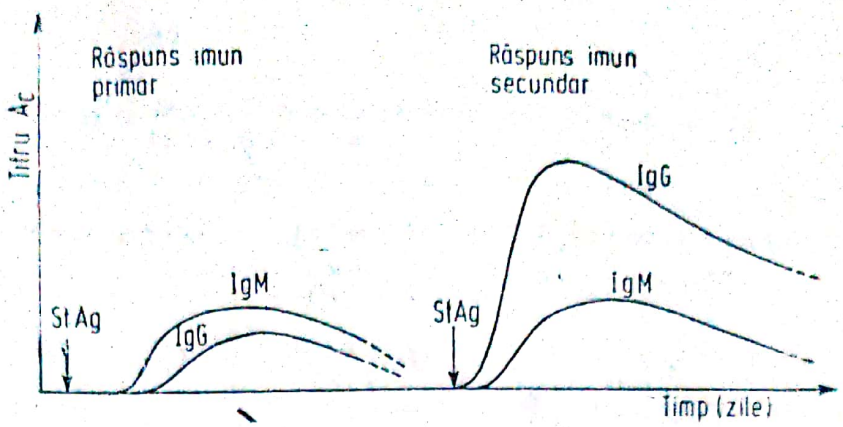


Fig. 2.30. **Reprezentarea schematică a răspunsului imun de tip primar şi secundar.**

Reinocularea aceluiaşi antigen declanşează *răspunsul de tip secundar:* titrul anticorpilor creşte rapid, exponenţial, după o perioadă de latenţă scurtă (cîteva ore pînă la 2—3 zile), atingînd un nivel maxim în 4—6 zile, nivel care este uneori de cîteva zeci de ori mai mare decît răspunsul primar. Perioada de stare, cu menţinerea anticorpilor la un nivel maxim, este şi ea prelungită, iar descreşterea se produce lent, putîndu-se detecta anticorpi după luni şi chiar ani de zile. În răspunsul de tip secundar apar IgM ca şi în cel primar, dar predomină net cantitativ IgG. Răspunsul de tip secundar se explică prin apariţia după primul stimul antigenic al limfocitului cu memorie şi persistenţa acestuia în organism.

Această dinamică a răspunsului imun este caracteristică unor imunogene, cum sînt de exemplu, cele proteice în soluţie. Pentru altele se înregistrează aspecte mult diferite de cel descris anterior. Astfel, în cazul antigenelor polizaharidice, anticorpii cresc rapid şi se menţin la valori ridicate perioade lungi de timp, după prima inoculare. Răspunsul secundar este abia sesizabil. Aceasta se explică prin persistenţa îndelungată a stimulului antigenic, polizaharidele eliminîndu-se extrem de lent din organism (după 5—8 luni). Prin repetarea inoculării de antigen se obţine o *hiperimunizare*. Paralel cu instalarea acestei stări, se augmentează afinitatea anticorpilor pentru antigen.

Imunitatea celulară recunoaşte o dinamică similară în răspunsul primar şi secundar. Pentru exemplificare, o grefă de piele allogenă este eliminată în medie în 8—11 zile; la o a doua grefă similară, timpul de eliminare se reduce la 3—5 zile.

În general, în cursul răspunsului secundar, toate consecinţele reacţiilor imune specifice, de cele mai multe ori, au cea mai amplă exprimare: producerea rapidă de anticorpi cu efecte fie protectoare, fie de hipersensibilitate imediată, instalarea fenomenelor de imunitate celulară sau de hipersensibilitate tardivă.

b. *Doza de antigen.* Există o relaţie strînsă între doza de Ag inoculată şi calitatea şi intensitatea răspunsului imun. Aşa cum se vede în figura 2.31, pornind de la doze extrem de mici, pg şi ajungînd la g, se pot distinge mai multe posibilităţi:

1. absenţa oricărui fenomen imun;

2. posibilitatea instalării unei toleranţe imunitare zise de zonă joasă (cantităţi mici de antigen);

3. o zonă în care nu se pot detecta anticorpii, dar apare celula cu memorie (animale „iniţiate" imun, „primed" în engleză);

Scanned with OKEN Scanner

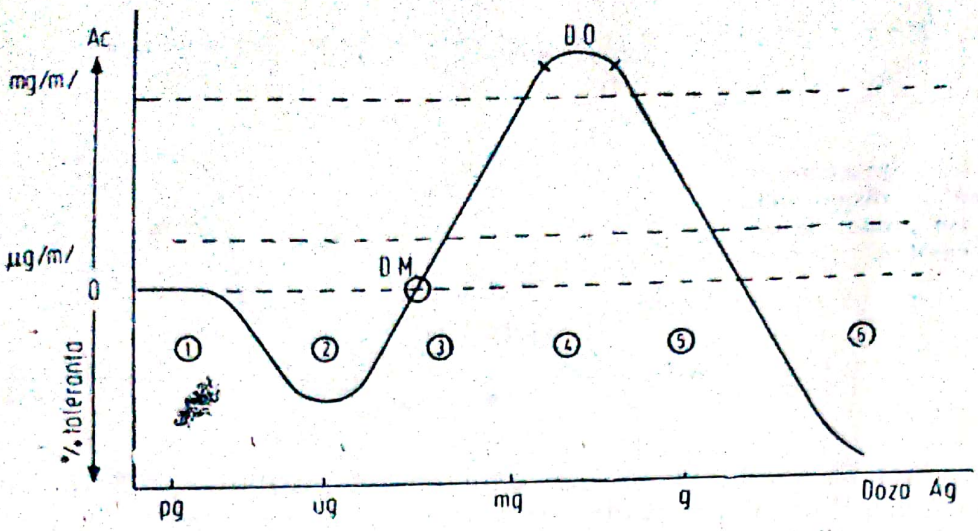


Fig. 2.31. Influența dozei de antigen asupra răspunsului imun:
D.O. = doză optimă; D.M. — doză minimă.

4. o zonă în care, la o anumită doză (doză limită sau prag), se detectează un răspuns imun după care urmează o creștere a titrului de anticorpi corespunzătoare măririi dozei, pînă ce se atinge o doză optimă;

5. o zonă de pseudotoleranță, în care cantitatea de antigen inoculată este suficient de mare pentru a forma complexe imune cu o parte mai mică sau mai mare din anticorpi (de aceea aceștia nu se pot evidenția prin reacțiile obișnuite);

6. cantități mari de antigen care induc toleranța, numită toleranță de doză mare sau de supraîncărcare antigenică. Dozele din zonele 1, 2, 3 sînt neimunogene.

Doza unică și doza fracționată. Fracționarea unei doze antigenice și inocularea repetată în timp vor declanșa, de regulă, un răspuns mai amplu decît administrarea întregii cantități într-o doză unică. Chiar divizarea aceleiași cantități de antigen și inocularea concomitentă în mai multe regiuni ale organismului duc la amplificarea răspunsului imun, printr-o angajare a unei suprafețe mai mari din sistemul limfoid.

Cantitatea de antigen influențează și instalarea tipului de imunitate. Astfel, hematiile de oaie inoculate i.v. în doze foarte joase, insuficiente pentru producerea de anticorpi, determină însă inducerea H.T. Dozele mari, optime pentru producerea de anticorpi, nu permit detectarea de H.T. S-a văzut că aceste doze mari nu împiedică apariția celulelor mediatoare de H.T., dar inhibă circulația limfocitelor specifice, care sînt sechestrate în organele limfoide.

Legea intervalelor. Repetarea stimulului antigenic duce la o amplificare a răspunsului imun, dacă se face la intervale optime așa cum se vede în tabelul 2.27. Stabilindu-se pentru fiecare imunogen astfel de relații între intervalul dintre inoculări și nivelul răspunsului imun, Zdrodowski a fundamentat „legea intervalelor", concept de valoare în stabilirea programelor de vaccinare.

c. *Imunizări asociate.* Multe date experimentale au demonstrat, că este posibil ca organismul să răspundă la stimulul concomitent al asocierii mai multor antigene. În imunizarea asociată trebuie să se țină seama că între antigene pot să apară *efecte sinergice,* în sensul că răspun-

Tabel 2.27

Influența intervalelor de timp dintre inoculările cu anatoxină tetanică asupra răspunsului imun

	Cantitatea de anatoxină	Intervalul de timp	1 ml de ser neutralizează
Doza I	0,5 ml	—	—
Doza II	2 ml	15 zile	1—10 DML
Doza III	2 ml	30 zile	100 DML
Doza IV	2 ml	8 zile	1000—2000 DML

sul imun față de fiecare component imunogen este amplificat de prezența celorlalți. Mai ales, sînt de luat în considerare efectele de competiție între antigene, în sensul că față de unul din constituenții asociației apare un răspuns de mare amplitudine, în timp ce față de celelalte, răspunsul este represat. Pe baza cunoașterii acestor relații se pot stabili vaccinuri asociate, cu efecte sinergice, utile în practica imunizării populației, cum sînt bivaccinul diftero-tetanic sau trivaccinul diftero-tetano-pertussis.

d. *Calea de pătrundere în organism.* Structurile limfoide sînt în mod diferit angajate în raport de pătrunderea Ag în organism: splina, față de antigenul ajuns în circulația generală, ganglionii limfatici regionali la stimularea periferică. Difuziunea antigenelor prin mucoasele cavităților naturale angajează sistemul limfoid local, avînd ca rezultat producerea IgA secretorii și în anumite condiții a IgE (mai ales, în deficiența de IgA_s). Inocularea intradermică și subcutanată evită instalarea toleranței, dar favorizează inducerea I.M.C. (cu precădere cea dermică). Aplicarea percutană are ca rezultat fie H.T., fie reacție cutanată cu bazofile. Administrarea intradermică este însoțită de o reacție inflamatorie, ceea ce face ca o cantitate mică de antigen să declanșeze un răspuns imun de amploare. De aceea este utilizată pentru vaccinarea B.C.G. sau alte vaccinări în care sînt folosite aparate speciale — dermojeturi —, care introduc antigenul în derm sub forma unui jet cu presiune ridicată. Pe cale digestivă Ag neproductibile ajung dificil să stimuleze organele limfoide, datorită degradărilor sau intervenției protectoare a IgA_s. Calea de pătrundere influențează atît amploarea răspunsului imun, cît și tipul de imunitate și chiar clasele de Ig. Astfel, pătrunderea pe mucoase favorizează formarea de IgE, iar cea subcutanată, prin hiperimunizare, de IgG, care pot interveni în blocarea efectelor reaginice. Calea de pătrundere și inoculare are o mare influență în modularea manifestărilor imune la un organism imunizat.

e. *Imunizarea de bază și rapel.* Cunoștințele privind instalarea răspunsului imun au fost folosite în practica medicală în stabilirea schemelor de vaccinare. Astfel, pentru fiecare vaccin se face o *imunizare de bază,* constînd din inocularea a 1—3 doze la intervale bine precizate, iar apoi în anii următori, efectuarea unei imunizări de rapel, cu o singură doză, care are ca rezultat consolidarea stării de imunitate, printr-un răspuns anamnestic similar celui secundar.

Scanned with OKEN Scanner

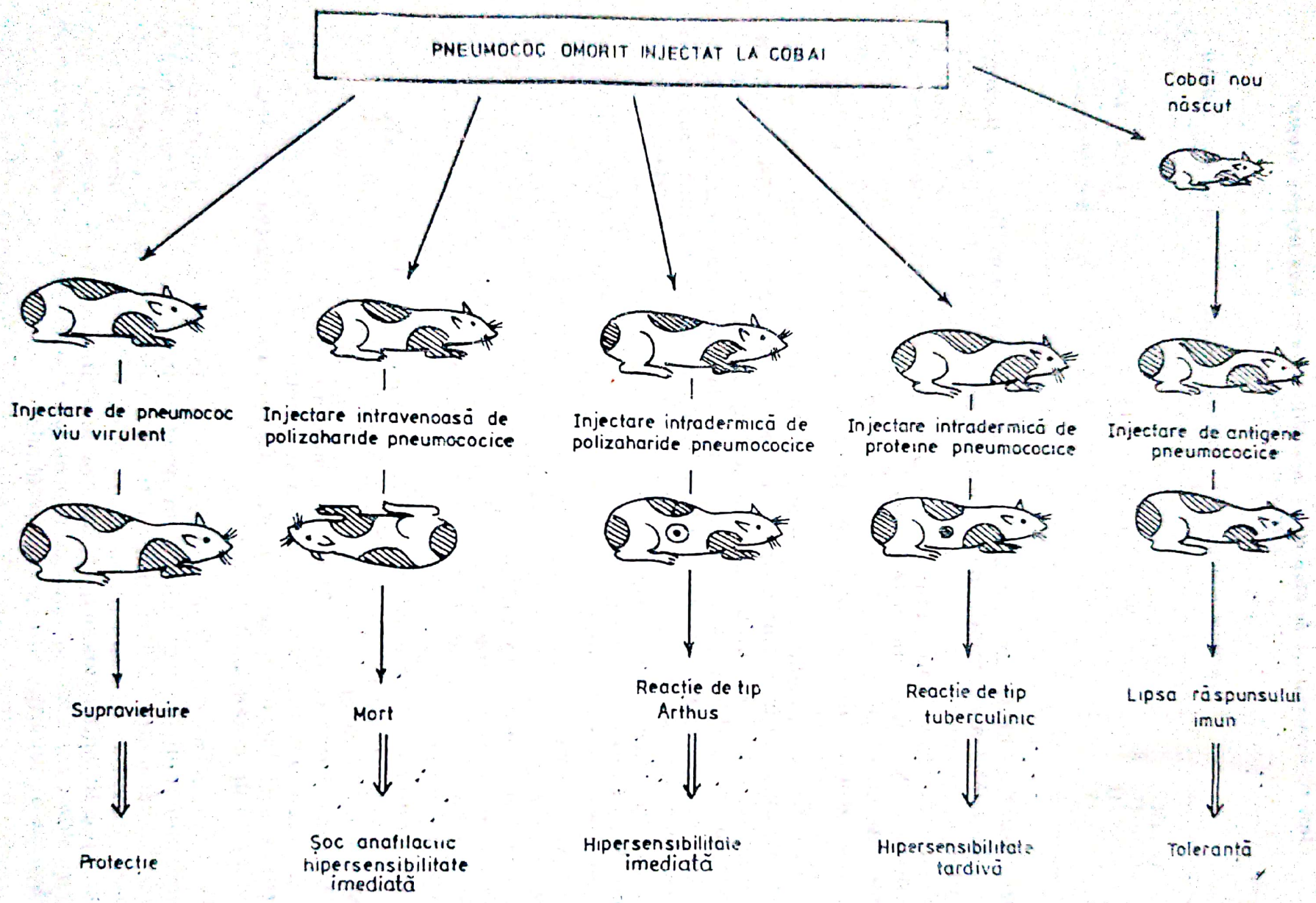


Fig. 2.32. Exprimarea diferită a manifestărilor imunitare în raport de proprietățile antigenului și calea de inoculare.

Scanned with OKEN Scanner

Instalarea imunității, așa cum s-a văzut nu este un fenomen simplu, stereotipic, desfășurat pe o singură direcție Ag → răspuns imun. El este un proces dinamic, cu o modulare complexă, realizată de o rețea de factori diferiți. Limfocitele pot fi privite ca celulele cele mai diferențiate și specializate ale răspunsului imun, cu cel mai mare domeniu de potențialitate și opțiuni, care sînt în mare măsură reglate de proprietățile și modul de prezentare ale Ag, ca și de un control genetic realizat în primul rînd de C.M.H. din organism. Limfocitele rămîn însă celulele de comandă, de fixare a direcțiilor tactice de realizare a răspunsului imun, în care L.T., prin subpopulațiile sale, au un hotărîtor rol reglator. Din poziția de comandă și execuție a L., reacția imună este asigurată prin antrenarea altor sisteme biologice cum sînt S.M.F. și P.M.N., sistemul C, de coagulare, fibrinolitic, kininoformator, sau mediatori de ordinul II (cAMP, cGMP, prostaglandine etc.). Se asigură astfel marea diversitate de manifestare și efecte biologice ale imunității. Pentru ilustrare, în figura 2.32, se vede că prin imunizarea cu pneumococ și apoi împărțirea animalelor imunizate în loturi, reacția imună este diferită în raport de calitățile Ag, de inocularea lui în organism, cu consecințe de apărare sau patologice.

2.6. MANIFESTĂRILE SISTEMELOR EFECTOARE ALE RĂSPUNSULUI IMUN

2.6.1. MANIFESTĂRI ALE IMUNITĂȚII UMORALE

1. **Formarea complexului imun elementar (C.I.E.) manifestare a poziției de combinare a Ig.** Pentru realizarea CIE este necesară unirea grupărilor determinante ale Ag cu pozițiile de combinare ale Ac (fig. 2.33), care trebuie să aibă o conformație sterică complementară, realizîndu-se astfel modalitatea generală și comună de manifestare a funcției de Ac.

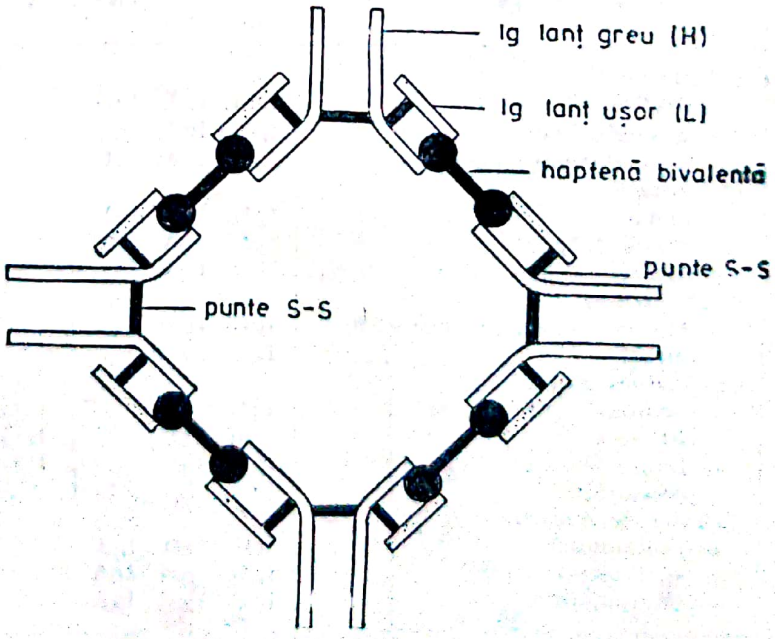


Fig. 2.33. **Formarea complexului imun elementar.**
Patru molecule de haptene bivalente s-au combinat cu patru molecule de IgG.

Condițiile ce duc la formarea CIE determină și proprietățile acestuia. Caracterul dominant îl constituie specificitatea imunologică, rezultată din relațiile stereochimice ale grupărilor respective. Formarea complexului are loc la suprafața moleculelor care nu se distrug; legătura este reversibilă, cele două molecule păstrîndu-și proprietățile inițiale după separare. Pentru combinarea Ag și Ac sînt necesare proporții echivalente, în funcție de greutățile moleculare și valențele lor.

2. **Manifestări dependente de întreaga moleculă de Ig.** În urma constituirii CIE manifestările ulterioare, care depind de întreaga moleculă de Ig, pot îmbrăca aspecte variate. Acestea sînt determinate de structura și proprietățile fizico-chimice ale Ag, funcțiile claselor și subclaselor de Ig, factorii de mediu în care are loc reacția (*p*H, temperatură, forță, ionică etc.), intervenția în unele cazuri a C′. Ținînd cont de aceste condiții și consecințele ce decurg de aici au fost descrise mai multe tipuri de reacții: aglutinare, precipitare, hemoliză, fixarea de C, neturalizare, opsonizare etc. Anticorpii evidențiați în acest fel au fost denumiți aglutinine, precipitine, hemolizine, anticorpi fixatori de C, neutralizanți, opsonine etc. Astăzi, cunoscînd structura și proprietățile Ig, dar mai ales, participarea lor diferențiată de clase în reacțiile Ag—Ac, aceste denumiri nu mai au un suport științific.

Dacă rezultatele unor reacții Ag—Ac se pot vizualiza mai ușor prin tehnici obișnuite, introduse mai demult în uzul laboratoarelor (aglutinare, precipitare, fixare de C), alteori sînt necesare procedee speciale de marcare (imunofluorescență, marcare radioimună sau enzimatică). Gruparea reacțiilor, intervenția claselor de Ig, ca și sensibilitatea în decelarea concentrațiilor de Ac, sînt prezentate în tabelul 2.28.

a. **Reacțiile de agregare** se bazează pe faptul că în urma formării CIE se realizează o rețea tridimensională prin alternarea moleculelor de

Tabel 2.28

Principalele reacții Ag-Ac

Reacția	Clase de Ig	Cantitatea minimă µg azot din Ac/ml
Aglutinare		
— bacteriană	IgM, IgA, IgG	0,01
— hemaglutinare	IgM, IgA, IgG	0,5 — 1
— hemaglutinare pasivă	IgM, IgA, IgG	0,001 — 0,03
Precipitare		
— inelară	IgG, IgA, IgM	20 — 30
— dublă difuzie	IgG, IgA, IgM	3 — 15
— difuzie radială	IgG, IgA, IgM	3 — 10
Neutralizarea		
— toxine bacteriene (difterică)	IgG, IgM, IgA	0,01
— virală	IgA, IgG	0,0001
Cu participarea C′		
— hemoliză (citoliză)	IgM, IgG_1, IgG_2, IgG_3	0,001 — 0,003
— fixare C′	IgM, IgG_1, IgG_2, IgG_3	0,01 — 0,1
— imunaderență	IgM, IgG_1, IgG_2, IgG_3	
— opsonizare	IgG_1, IgG_3, IgM	
Tehnici de marcare		
— radioimună	IgG, IgM, IgA	$\leqslant$ 0,001
— enzimatică	IgG, IgM, IgA	0,001
— imunofluorescență	IgG, IgM, IgA	

Scanned with OKEN Scanner

Ag și Ac, în care se dispun agregate de Ag, pe ale căror grupări determinante sînt fixați Ac. În *reacția de aglutinare* Ag este reprezentat de suspensii celulare, fiecare avînd la suprafață multe grupări determinante. Ca atare, agregarea nu se poate realiza prin Ig monomerice, ci numai de către cele polimerice; din aceste motive rolul esențial este deținut de IgM pentamerice, cu 5—10 valențe. Reacțiile de *precipitare* au ca substrat molecule în soluție, uneori haptene, cu una sau puține grupări determinante; în consecință agregarea se realizează prin Ac cu puține valențe, mai ales din clasa IgG.

b. Un rol important în reacțiile de laborator sau care au loc în organism cu ocazia unui proces infecțios revine **sistemului C** (2.4.3.), în care se evidențiază și mai bine intervenția întregii molecule a Ig. Participarea C′ este strîns condiționată de existența pe Fc-ul moleculelor de Ac a receptorilor specifici pentru C. Ca urmare, în asemenea reacții vor interveni direct numai Ig din clasele și subclasele IgG_1, IgG_2, IgG_3 și IgM.

c. **IgA secretorii** se află în salivă, lacrimi, mucoasa nazală, bronșică, intestinală etc. Ținînd cont de faptul că aceste mucoase ale organismului reprezintă poarta de intrare pentru numeroși agenți patogeni, se apreciază că IgA secretorii constituie un factor primordial în imunitatea locală. În ultima vreme s-a emis ipoteza că funcția principală a acestor Ac nu ar consta în distrugerea Ag prezent în intestin și mucoasele respiratorii, ci mai degrabă de a preveni adsorbția locală a acestuia, prin formarea de complexe Ag—Ac, care vor fi degradate de enzimele existente. Pe de altă parte, IgA agregate pot realiza procese de citoliză cu intervenția C′, prin activarea acestui sistem pe cale alternativă.

d. O comportare deosebită au Ac din **clasa IgE** (reaginele), cu 100 aminoacizi mai mulți pe lanțul greu (un domeniu) și proprietăți marcate de citofilie. Produși în urma unui stimul antigenic, se leagă de suprafața unor celule (mastocite, bazofile). Cu ocazia unei a doua pătrunderi în organism a aceluiași Ag, după difuzare, el se va fixa de IgE specifice, prezente pe suprafața celulelor, realizînd complexul Ag—Ac. Are loc degranularea celulelor (fig. 2.34), urmată de eliberarea unor substanțe chimice (histamină, serotonină, substanța lent reactivă pentru anafilaxie etc.), cu acțiune asupra musculaturii netede și endoteliilor vasculare; apar simptomele clinice anafilactice (spasm bronșic, astm, erupții cutanate etc.). IgE sensibilizează, în special, țesuturile bogate în mastocite cum sînt cel pulmonar și cutanat. Ac din această categorie, ca și reacțiile lor cu Ag, se pot evidenția prin teste de laborator care cuantifică eliberarea histaminei; este posibilă efectuarea reacției *in vivo* (fenomenul Schultz—Dale). Pe de altă parte, se poate realiza transferul pasiv de IgE prin inoculare intradermică de ser la un receptor normal (reacția Praus-nitz—Kustner).

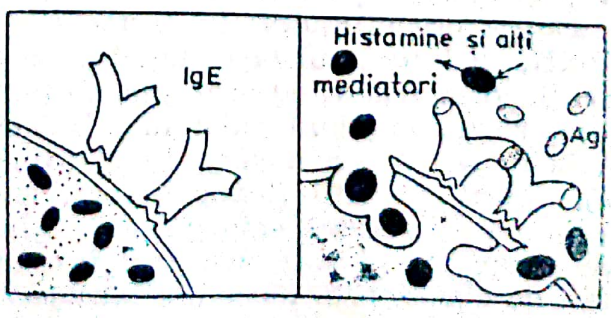


Fig. 2.34. **Degranulația mastocitelor.**

În afara cestei *reacții de hipersensibilitate de tip imediat (HI)* sau *de tip I* (anafilactică), bazată pe IgE, au mai fost descrise și alte manifestări patologice, cu alterări tisulare, consecințe a proceselor inflamatorii declanșate de crearea complexului Ag—Ac (tabel 2.29). Astfel *HI de tip II, citotoxic* este rezultatul reacției Ac cu Ag de pe suprafața celulelor, urmată de activarea C. *Tipul III* cuprinde manifestări realizate prin complexe Ag—Ac circulante, cu localizări vasculare și tisulare, în care intervine de asemenea C′.

e. În cazul Ag reprezentați de toxine, produși extracelulari netoxici ai bacteriilor (hemolizine, hialuronidaze etc.), veninuri, virusuri, formarea complexului duce la **neutralizarea efectelor biologice ale acestora,** prin acțiunea Ac specifici (IgG, IgM, IgA). Evidențierea neutralizării se face în majoritatea cazurilor pe animale sensibile, sisteme celulare sau chiar în organismul uman (reacția Schick-difterie). Reacțiile de neutralizare sînt deosebit de importante în profilaxia și tratamentul bolilor infecțioase ocazionate de agenți patogeni ce acționează prin exotoxine. În infecțiile virale, Ac specifici neutralizează pozițiile de atașare ale virusului, împiedicînd astfel atașarea pe receptorii celulari.

2.6.2. MANIFESTĂRI ALE EFECTORILOR IMUNITĂȚII MEDIATE CELULAR

1. **Limfocitele T activate** (efectoare) constituie, prin acțiune directă, sau prin intermediul limfokinelor, principalii efectori ai imunității mediate celular. Subpopulația de limfocite citotoxice (ucigașe), cu efect distructiv asupra celulelor țintă ce poartă antigeni față de care ele au fost sensibilizate, intervine în multiple procese de apărare ale organismului împotriva unor boli bacteriene, virale, parazitare sau de altă natură. Așa de pildă, celule găzduind virusuri și care exprimă la suprafață antigene de natură virală sînt distruse de limfocitele citotoxice. Un fenomen similar intervine în reacțiile de respingere a grefelor, transplantelor sau a unor celule tumorale. Efecte de citotoxicitate mai pot fi realizate de către populația de limfocite nule (ucigașe naturale) și macrofagele activate (tabel 2.30).

Limfocitele T angajate antigenic intervin ca efectori importanți și în fenomenele de *hipersensibilitate de tip tardiv* (HT), altă manifestare a imunității mediate celular (v. tabel 2.29). La a doua întîlnire cu Ag respectiv, ele vor răspunde prin eliberare de limfokine, mai cu seamă factor chemotactic și MIF (tabel 2.31). Acestea duc la acumularea și activarea macrofagelor în focarul infecțios, și apoi la digerarea completă a agenților patogeni. De multe ori, în urma acțiunii combinate a limfocitelor T și macrofagelor, se produc focare de necroză, cu efecte nefavorabile asupra organismului. În asemenea cazuri, se observă o acumulare de PMN, cu intens rol fagocitar. Starea de HT se instalează și se poate evidenția prin reacții cu scop diagnostic în multe îmbolnăviri provocate de bacterii (tuberculoză, tularemie, bruceloză, limfogranulomatoză inghinală benignă, șancru moale), fungi (candidoză, histoplasmoză, blastomicoză), diferiți paraziți (toxoplasmoză, leishmanioză, echinococoză), virusuri (herpes, parotidită epidemică etc.). În general, pielea reprezintă locul unde aceste reacții se evidențiază mai bine, motiv pentru care testările se fac, de obicei, prin inoculare intradermică. Eritemul, edemul și uneori

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.29

Clasificarea reacţiilor de hipersensibilitate şi principalele caracteristici

Denumirea / Caracteristici	Tip I anafilactică	Tip II citotoxică	Tip III complexe imune	Tip IV „tardivă" (mediată celular)
Clasa de Ig	IgE	IgG, poate şi altele	Toate	Nici una
Ag interesate	Heterologe	Autologe, haptene	Autologe, heterologe	Autologe, heterologe
Intervenţia C′	Nu	Da	Da	Nu
Celule interesate	Mastocite, bazofile	Hematii, leucocite, trombocite etc.	Celule ale ţesuturilor gazdă	Celule ale ţesuturilor gazdă
Mecanism	Produse ale mastocitelor	Citoliză dependentă de C′	Blocarea vaselor sau ţesuturilor prin complexe imune, participarea C′	Limfocite T, limfokine, macrofage
Boli produse	Şoc anafilactic, febra de fîn, astm, urticarie	Racţii posttransfuzionale, trombocitopenie, boli de Rh, unele glomerulonefrite	Boala serului, reacţii Arthus	Hipersensibilitate la infecţii (tuberculoză, bruceloză, herpes etc.) paraziţi (echinococoză etc.) şi alte Ag

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.30

Tipuri de citotoxicitate mediate celular

Celula efectoare	Sensibilizarea celulei efectoare	Celula țintă și efecte *in vivo*
1. Limfocit T citotoxic	Selecție clonală, proliferare și diferențiere	Distruge celule conținînd agenți infecțioși, celule tumorale și de transplant
2. Macrofag activat	Limfokine	Distruge celule conținînd agenți infecțioși, celule tumorale
3. Limfocite nule ucigașe	Nu este cazul	Distruge diferite celule

necroza, ce apar la locul inoculării, se datoresc mai ales constituirii unui gel de fibrină, alterărilor endoteliilor vasculare și ale sistemului de coagulare. Acestora li se adaugă acumularea de celule mononucleare (limfocite, macrofage). În afara leziunilor cutanate, fenomenele HT se pot manifesta și în alte țesuturi ca mucoasa conjunctivală, a vezicii urinare, uter, colon, ficat, articulații etc.

2. **Limfokinele,** elaborate de o subpopulație a limfocitelor T, sînt substanțe importante în realizarea și modularea răspunsului imun. Principalele limfokine cunoscute și funcțiile acestora sînt prezentate în tabelul 2.31.

Tabel 2.31

Principalele limfokine și celulele interesate

Celule interesate	Limfokine
1. Macrofage	Factor chemotactic Factor de agregare Factor de inhibare a migrării macrofagelor (MIF)
2. Polimorfonucleare	Factor chemotactic Factor de inhibare a migrării leucocitelor (LIF)
3. Limfocite	Factor mitogen Factor de transfer al HT
4. Alte celule	Limfotoxine
5. Virusuri	Interferoni

Prin intermediul factorului chemotactic se realizează acumulare de celule fagocitare la nivelul focarului infecțios, urmată de multe ori de înglobare și digerare. Ținînd cont de faptul că în general, fagocitoza nu se poate produce decît după o prealabilă opsonizare, cu participarea sistemului C′, reiese și în acest caz întrepătrunderea ce are loc *in vivo,* între efectorii imunității umorale și a factorilor de rezistență naturală. Limfokinele responsabile de inhibarea migrării macrofagelor și PMN intervin în apărarea organismului prin menținerea concentrației crescute de fagocite la nivelul focarului infecțios. Avînd în vedere că în același timp are loc și acumularea de limfocite T și B, se realizează sensibilizarea și diferențierea acestora (factor mitogen), precum și activarea macrofagelor. În sfîrșit, nu poate fi trecută cu vederea producerea de interferoni, cu intervenție principală în infecții virale.

Scanned with OKEN Scanner

3. **Macrofagele activate** sînt efectori importanți ai imunității mediate celular, ca atare, sau prin mediatori eliberați. Digerarea de către macrofage a bacteriilor sau virusurilor conținute (fagocitoză), precum și a unor celule ce conțin agenți patogeni sau celule tumorale (citotoxicitate), constituie un mecanism important pentru menținerea stării de sănătate. La acestea se adaugă intervenția lor în stările de HT. Trebuie de asemeni subliniată funcția secretorie, datorită căreia macrofagele au rol de reparare a leziunilor rezultate din inflamație și care produc factori cu acțiune antibacteriană (lizozim) sau antivirală (interferoni).

Deci, în răspunsul imun, umoral sau mediat celular, efectorii acestuia acționează de multe ori succesiv sau simultan, realizînd un ansamblu de procese ce duc la păstrarea stării de sănătate a organismului sau instalarea bolii. Trebuie de asemeni reținut faptul că deseori efectorii imunitari condiționează sau sînt condiționați, de factorii rezistenței naturale.

2.7. IMUNITATEA CA FUNCȚIE HOMEOSTATICĂ. APĂRAREA ANTIINFECȚIOASĂ. DEVIERI ALE RĂSPUNSULUI IMUN

Sistemul limfoid și funcția imunitară realizată de acesta au apărut pe o anumită treaptă a evoluției filogenetice și s-au dezvoltat în paralel cu alte funcții ale organismelor animale, la care au devenit necesare mecanisme din ce în ce mai complexe și mai diversificate de control a menținerii echilibrului intern. Pornind de aici, răspunsul imun și manifestările sale trebuie integrate în sistemele funcționale de păstrare a homeosteziei față de influența nefavorabilă a unei agresiuni cu distribuție largă — factorul infecțios.

În mod similar, în evoluția ontogenetică factorul infecțios, prin acțiunea sa ca și cauză determinantă în îmbolnăvire sau ca stimul antigenic, constituie o importantă posibilitate de perturbare a homeostaziei și totodată un inductor selectiv principal al dezvoltării sistemului imun. De aceea imunitatea trebuie privită în primul rînd, ca o funcție homeostatică, selectată și diferențiată în conexiune principală cu necesitatea de apărare față de agresiunea microbiană. Caracterizată în acest fel, imunitatea posedă un sistem celular și de efectori proprii, care au capacitatea să antreneze alte sisteme biologice și, mai ales, factorii de rezistență naturală. Aceasta a făcut necesară evoluția unei rețele de reglare a funcției imunitare, în care un loc central îl ocupă L.T. Acceptînd însă încadrarea imunității ca una din principalele funcții homeostatice, implicit, ca și pentru alte funcții de acest gen, se poate presupune intervenția reglatorie a S.N.C. Informațiile privind însă acest aspect sînt extrem de contradictorii dată fiind însăși complexitatea problemei și, mai ales, dificultățile de investigare. Pentru fagocitoză cel puțin, rolul reglator al SNC a fost cu claritate demonstrat. Pentru răspunsul imun datele sînt mai puțin clare. Se desprinde însă intervenția posibilă a hipotalamusului cu rol de modulare, așa cum s-a evidențiat prin lezarea unor zone bine țintite sau prin stimularea acestora.

Scanned with OKEN Scanner

2.7.1. IMUNITATEA ŞI APĂRAREA ANTIINFECŢIOASĂ

Încă din timpul vieţii fetale şi mai pronunţat după naştere şi ulterior în tot timpul vieţii, organismul uman se găseşte în permanent conflict cu factorul infecţios. Faţă de acesta organismul reacţionează prin funcţia de *apărare antiinfecţioasă,* care are cîteva intervenţii importante: vindecarea dintr-o infecţie manifestă, împiedecarea reinfecţiei cu acelaşi agent etiologic şi prevenirea primoinfecţiei. În felul acesta se realizează unul din efectele biologice favorabile ale imunităţii. Aceste modalităţi de apărare se întîlnesc în toate infecţiile *microbiene*-bacteriene, cu protozoare, micotice, parazitare şi virale, în care se regăsesc trăsături comune. Ţinînd însă seama de mecanismele specifice prin care aceste categorii de agenţi infecţioşi declanşează procesul infecţios, apar în consecinţă particularităţi distincte şi diversificate de apărare.

1. **Apărarea antibacteriană** se realizează diferenţiat în raport de proprietăţile speciei patogene, poarta de intrare, localizarea în organismul uman, diversitatea factorilor de patogenitate şi a mecanismelor prin care aceştia acţionează. Trecînd peste aceste diferenţe, se poate însă generaliza, că în majoritatea infecţiilor, apărarea este rezultatul unei acţiuni sinergice şi ordonate a proceselor de I.U., I.M.C. şi a factorilor de rezistenţă naturală.

Intervenţia fagocitelor, prima „armată" care intră în joc în apărare, are un caracter general, vizînd aproape toate bacteriile, ca şi alte microorganisme. Trebuie subliniat că fagocitoza acţionează în tot timpul infecţiei: împiedecarea instalării agenţilor infecţioşi la poarta de intrare (evitarea primoinfecţiei şi reinfecţiei), limitarea multiplicării şi generalizării bacteriilor, constituind în acelaşi timp modalitatea principală de eliminare a microorganismelor din ţesuturile gazdei, ceea ce are ca rezultat vindecarea. Chiar dacă acţionează diferiţi factori imunitari sau chimioterapice, fagocitoza este cea care în final, asigură sterilizarea organismului de bacterii patogene. În majoritatea cazurilor funcţia fagocitară este dependentă de efectori ai I.U. (anticorpi), ai I.M.C. şi a altor sisteme biologice.

O contribuţie majoră în apărarea antibacteriană o au procesele imunitare. Se poate aprecia că, în toate infecţiile se dezvoltă paralel o I.U. şi o I.M.C., cu variaţii de intensitate de la o infecţie la alta. În infecţiile cu exotoxine ca factor principal de patogenitate, cu contribuţie majoră de apărare este I.U., prin procesul de neutralizare. În alte infecţii, în care microorganismele se multiplică facultativ intracelular, rolul principal îl au procesele de I.M.C. cum este de exemplu, procesul infecţios al tuberculozei. Tot aşa în multe infecţii virale, în micozele viscerale şi în parazitoze, intervenţia I.M.C. a devenit evidentă. În majoritatea infecţiilor însă, funcţia de apărare este asigurată prin participarea în proporţii diferite şi cu intensitate variată, a sistemelor efectoare a celor două tipuri de răspuns imun. Funcţia de apărare se realizează în primul rînd, prin eliminarea cît mai rapidă a antigenului străin pătruns în ţesuturile organismului, sau neutralizarea efectelor nocive ale acestuia. Pentru exotoxine, neutralizarea este extrem de operantă, cu o condiţie limitantă: acest efect se produce numai faţă de exotoxina prezentă în spaţiul extracelular. După pătrunderea ei în celulă, neutralizarea este lipsită de eficienţă. Aceasta se datoreşte în special, faptului că anticorpii neutralizanţi se fixează pe fragmentul de exotoxină pe care se găsesc poziţiile de ata-

Scanned with OKEN Scanner

şare pentru receptorii celulari, împiedecînd astfel penetrarea în celulă (la multe exotoxine fragmentul B). Neutralizarea interesează de asemenea produşii extracelulari netoxici. Deoarece aceştia nu sînt factori de iniţiere sau factori majori de patogenitate, în infecţie, neutralizarea lor are o contribuţie principală în controlul evoluţiei bolii.

Pentru celulele bacteriene şi ale altor microorganisme, eliminarea se realizează printr-un proces complex. În prim plan se produce opsonizarea prin acţiunea comună a anticorpilor. Formarea complexului Ag—Ac favorizează prin receptorii pentru Fc-ul Ig sau pentru C3, ataşarea bacteriilor pe celula fagocitară şi, pe această cale, înglobarea lor. Se consideră apoi că efectul comun Ig — C facilitează de asemenea degradarea intracelulară. În afară de aceasta, reacţiile de agregare (aglutinarea pentru celule şi precipitarea pentru produşii solubili) împiedecă difuziunea în ţesuturi şi mai ales, promovează fagocitarea agregatelor. Este apoi posibil ca anticorpii să se fixeze pe pili sau alţi determinanţi de aderare pe mucoase şi să împiedece astfel iniţierea infecţiei.

Un rol major de amplificare a reacţiilor imune îl are antrenarea SC. Activarea SC. pe suprafaţa celulelor gramnegative are efect litic (bacterioliză) sau efect bactericid, mai ales prin acţiunea sinergică cu lizozimul. În afară de aceasta prin produşii biologici rezultaţi din activare, SC. are un rol cheie în echilibrarea reacţiei inflamatorii. Într-o apreciere generală se poate considera că apărarea prin I.U. intervine, mai ales, faţă de bacteriile cu multiplicare extracelulară.

I.M.C. îşi exercită acţiunea antibacteriană prin producerea de limfokine cu diferite celule ţintă şi efecte multiple, între care poate fi amintită instalarea inflamaţiei cu infiltrat mononuclear. Funcţie importantă antimicrobiană are apoi macrofagul, care prin cooperare cu L.T. devine activat, cu o capacitate crescută de oprire a multiplicării bacteriene şi cu efect bactericid crescut. Prezenţa HT în multe infecţii bacteriene, ca şi evidenţierea instalării I.M.C. prin teste specifice, între care larg utilizate sînt testele M.I.F. şi L.I.F., a făcut posibil să se stabilească o participare importantă a acestui tip de imunitate în multe infecţii bacteriene. Trebuie apoi subliniat că procese de IMC sînt răspunzătoare de evoluţia cronică care se întîlneşte în unele infecţii bacteriene şi, în primul rînd, în tuberculoză. S-a reamintit poziţia centrală a L.T. în modularea prin cooperare celulară a răspunsului imun. Pornind de aici, este evident că subpopulaţiile de LT intervin direct sau modulator în controlul efectelor distincte ale factorilor de patogenitate. Este de aceea posibil ca în aceeaşi infecţie să survină o contribuţie diferenţiată: faţă de o categorie de factori intervin preponderent efectorii I.U., pe cînd faţă de alţi determinanţi de patogenitate efectul imunitar de apărare se instalează prin componenţii IMC.

În funcţia de apărare, *imunitatea locală* este foarte importantă deoarece poate opri instalarea microorganismelor la poarta de intrare. Intervin cu precădere IgA secretorii, care sînt sintetizate de sistemul limfoid local, din submucoase, ceea ce explică concentrarea lor în secreţii. Este posibilă o asociere a IgM. Imunitatea locală este întregită de participarea LT, care fie din sistemul limfoid local, fie prin proprietatea lor recirculantă, pot întîlni antigenul în aceste poziţii şi iniţia reacţii ale I.M.C. cu efect de apărare.

2. **Imunoprofilaxia.** Cunoaşterea proceselor imunitare a dus la o perfecţionare a metodelor de profilaxie specifică a infecţiilor, componentă

Scanned with OKEN Scanner

importantă a activității medicale. Imunoprofilaxia are la bază, mai ales, *imunizarea activă cu ajutorul vaccinurilor a întregii populații* sau a grupelor de subiecți susceptibili. Prima metodă de vaccinare a fost introdusă de E. Jenner (1798), care a observat că mulgătorii de vaci sînt, de regulă, feriți de variolă. Pornind de la această constatare, din leziunile variolei bovinelor, prezente pe uger, a trecut produs patologic la om, inducîndu-se astfel imunitate față de variola umană. Metoda a fost numită **vaccinare** (*vacca* în l. latină = vacă). Pasteur, prin obținerea unor variante bacteriene cu virulență diminuată la *Bacillus anthracis*, a fundamentat științific și experimental imunizarea prin vaccinare.

Un **vaccin** este un produs biologic preparat din bacterii, virusuri, sau din produșii acestora, care administrat la om, induce o imunitate specifică, fără să declanșeze procese nocive. Vaccinurile se prepară din bacterii (vaccinuri bacteriene) sau din virusuri (vaccinuri virale). Vaccinurile bacteriene se obțin din anatoxine sau din celule. Celulele pot fi inactivate (omorîte), mai ales, prin căldură sau substanțe chimice (de exemplu, formaldehidă) sau pot fi celule vii ale unor variante (mutante) cu virulență diminuată. Se mai pot produce vaccinuri din componente celulare (de exemplu, polizaharid capsular din pneumococ sau meningococ). Vaccinurile utilizate la noi în țară sînt produse de către Institutul Cantacuzino și se pot vedea în tabelul 2.32. Dintre acestea, două vaccinuri sînt preparate

Tabel 2.32

Vaccinuri bacteriene utilizate la noi în țară

Vaccinul	Preparat din	Indicații
Difteric	Anatoxină	Obligator la copii
Tetanic	Anatoxină	Obligator la copii
Pertussis	Celule inactivate	Obligator la copii
B.C.G.	Celule vii cu virulența diminuată	Obligator la copii nou născuți și cei cu IDR la PPD negativă
Tific	Celule de *S. typhi* inactivate	Grupe de populații selectate pe criterii epidemiologice
Holeric	Celule de *V. cholerae* inactivate	Grupe de populații selectate pe criterii epidemiologice
Stafilococic	Anatoxină	Infecții cronice stafilococice; utilizare mai ales, în scop terapeutic
Piocianic	Celule de *P. aeruginosa* inactivate	Prevenirea infecției la persoane cu arsuri extinse

din anatoxină: anatoxina tetanică și difterică. Alte vaccinuri sînt constituite din celule bacteriene inactivate: *Bordetella pertussis, Salmonella typhi, Vibrio cholerae, Pseudomonas, Staphylococcus* etc. Vaccinurile din celule vii de BCG (Bacile Calmette-Guérin) numite astfel deoarece cei doi cercetători au obținut prin menținerea unei tulpini de b. tuberculos bovin în pasaje succesive pe cartof glicerinat și biliat timp de 13 ani, o variantă cu virulență scăzută, dar capabilă să inducă I.M.C. Pentru fiecare vaccinare se precizează schema de vaccinare: intervalul dintre doze în imunizarea de bază, precum și intervalul de timp la care se face vaccinarea de rapel (revaccinarea), asigurîndu-se astfel nivelul imunitar protector.

Scanned with OKEN Scanner

Ministerul Sănătății stabilește pe această bază în fiecare an un calendar al vaccinărilor obligatorii. Fac parte din această categorie următoarele vaccinări: *antidifterică, antitetanică, antipertusis* (se administrează obișnuit sub formă de trivaccin diftero-tetanic-pertussis) și *antituberculoasă*. Vaccinul tific și vaccinul holeric se aplică la grupe de populații cu risc crescut de îmbolnăvire sau în condiții epidemiologice speciale. Vaccinul preparat din celule de b. piocianic se utilizează în scopul prevenirii infecției cu această bacterie la cei cu arsuri extinse, cu mare susceptibilitate la acest tip de infecție. Anatoxina stafilococică asociată cu autovaccin (vaccin preparat din tulpina bacteriană izolată de la bolnav) sau cu vaccin stafilococic se folosește terapeutic în formele de infecție stafilococică cu evoluție cronică.

În studiu experimental se găsește un vaccin antidizenteric preparat din variante cu virulență diminuată de *Sh. flexneri*. Alte vaccinuri se folosesc la animale (antibrucelos, anticărbunos) sau la om în condiții epidemiologice speciale, cum este de exemplu, vaccinul pentru tifosul exantematic dintr-o variantă cu virulență diminuată (tulpina E).

Seroterapia și seroprofilaxia. În 1890, Behring și Kitasato au arătat că serul animalelor imunizate cu toxina difterică neutralizează toxina. Din 1891 serul animalelor imunizate s-a folosit în terapia difteriei, punct de pornire al seroterapiei în infecții. Trebuie însă precizat că în 1889, V. Babeș a publicat utilizarea serului antirabic, asociat cu vaccinul, în prevenirea rabiei. De aceea, respectînd prioritatea, V. Babeș trebuie considerat întemeietorul seroterapiei și seroprofilaxiei. Prin utilizarea serurilor hiperimune se transferă imunitatea pasivă, care se instalează rapid, imediat după inocularea serului și are de aceea, utilizare, mai ales, în terapie. Serurile hiperimune se obțin prin hiperimunizarea unor animale mari (cal), de aceea ele sînt heterologe. Metoda a avut în trecut un rol important în reducerea mortalității prin unele boli infecțioase. După apariția chimioterapicelor, utilizarea serurilor s-a restrîns la cele toxice: antidifteric, antitetanic, antibotulinic și la cele mixte (antitoxice și antibacteriene) — antigangrenă gazoasă, anti b. perfringens și anticărbunos. În ultima vreme, cu remarcabil succes, a fost introdus în terapia și profilaxia infecțiilor cu b. piocianic la subiecți cu arsuri extinse, serul anti-b. piocianic (antibacterian).

Seroterapia prin ser heterolog (tabel 2.33) are dezavantajul apariției destul de frecvente a accidentelor de hipersensibilitate. Unele din acestea sînt de tip atopic, putînd ajunge pînă la *șoc anafilactic* (dacă subiectul a primit anterior ser de cal) sau la apariția bolii serului (la prima inoculare). Pentru prevenirea șocului anafilactic se recurge la metoda desensibilizării Besredka prin administrarea repetată a unor cantități foarte mici de ser. În ultima vreme se folosesc preparate de seruri parțial purificate prin îndepărtarea albuminelor, pentru a reduce apariția acestor accidente.

Serul uman de la convalescenți, cu toate că nu se însoțește de complicațiile amintite, nu se mai utilizează datorită pericolului transmiterii hepatitelor virale, mai ales hepatita B. S-au obținut însă concentrate de Ig, numite convențional *gamaglobuline*, care se prepară din amestecul sărurilor provenite de la 1000 de subiecți. Se ajunge la o concentrare a Ig de pînă la 15 ori față de cantitatea din ser. Prezintă următoarele avantaje: sînt lipsite de pericolul transmiterii hepatitelor, permit administrarea unei cantități de Ig într-un volum mic și sînt stabile pe durată

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.33

Seruri hiperimune şi preparate de gamaglobuline folosite în imunoprofilaxie şi imunoterapie

	Sursa	Scopul principal	Observaţii
		Seruri hiperimune	
Antitoxice Antidifteric Antitetanic Antibotulinic **Antimicrobiene şi antitoxice** Anti *C. perfringens* Anticărbunos	Cal; preparate parţial purificate	Terapeutic	Declanşează fenomene de hipersensibilitate de tip imediat, inclusiv şoc anafilactic sau boala serului
		Preparate de gamaglobuline	
Gamaglobulină	Umană	Profilactic: rubeolă, rujeolă, oreion, hepatita cu virus A, agamaglobulinemie congenitală	Apariţia foarte rară a fenomenelor de hipersensibilitate de tip imediat
Gamaglobuline hiperimune Antidifterică Antirabică Antivariceloasă Antiherpetică Antirujeoloasă Antimalarică	Umană	Profilactic, terapeutic	

relativ lungă de timp. Dezavantajul este că au tendinţă de agregare, neputînd fi administrate intravenos, iar prin inoculări repetate pot induce stări de hipersensibilizare (izoimunizare prin allotipuri). Aşa cum se vede din tabelul 2.33 cele mai largi aplicaţii se întîlnesc în infecţiile virale: rujeolă, hepatite, rabie, varicelă, ş.a. De asemenea O.M.S. recomandă înlocuirea serurilor heterologe cu preparate de gamaglobulină hiperimună, obţinute din serul unor subiecţi imunizaţi prin vaccinare sau de la convalescenţi. Între acestea intră şi gamaglobulinele antitoxice: difterică, tetanică. De mare utilitate s-a dovedit terapia de înlocuire a gamaglobulinei la subiecţi cu gamaglobulinemie congenitală.

O utilizare cu indicaţii speciale o au Ig anti Rh(D), care pot preveni, dacă sînt administrate într-o schemă raţională, accidentele ce pot surveni prin izoimunizare Rh şi pot înlocui cu mult succes alte modalităţi terapeutice. La aceasta, să adăugăm că serul antilimfocitar poate fi folosit ca un agent imunosupresor, cu aplicaţii terapeutice importante în chirurgia de transplant.

2.7.2. APLICAŢII ALE MANIFESTĂRILOR EFECTORILOR IMUNITARI ÎN PRACTICA MEDICALĂ

1. **În diagnosticul bolilor infecţioase,** reacţiile Ag—Ac sau manifestările IMC ocupă un loc important. Alegerea tipului de reacţie Ag—AC este dependentă, în primul rînd, de particularităţile specifice ale imuni-

Scanned with OKEN Scanner

cății în fiecare infecție. Se poate însă aprecia că în infecțiile cu bacterii gramnegative se folosesc, mai ales, reacțiile de aglutinare (de exemplu, Widal, Wright, Weil-Felix). Apoi, în infecțiile în care exotoxinele sau produșii extracelulari netoxici joacă rol de factori de patogenitate, se obțin informații prețioase prin efectuarea reacțiilor de precipitare sau neutralizare. Pentru infecția virală reacțiile de inhibare a hemaglutinării, rfc-ul și reacțiile de neutralizare sînt de largă utilizare. În ultima vreme în diagnosticul de infecție microbiană (bacteriană, virală, cu protozoare și micete), prin marea lor sensibilitate și specificitate, se folosesc cu rezultate foarte bune, reacțiile cu marcare: imunofluorescența, marcarea enzimatică (ELISA) sau marcarea radioactivă. Fără să se poată stabili o schemă generală, dependent de experiența tehnică a fiecărui laborator, pot să fie selecționate reacții serologice, care în contextul simptomatologiei clinice, să ofere argumente hotărîtoare pentru diagnostic. În multe infecții și mai ales, în cele cu agenți facultativ sau obligator paraziți celulari, testele care evidențiază I.M.C. au o mare valoare diagnostică. Între acestea, reacțiile intradermice de H.T, prin simplitatea efectuării lor, sînt mult aplicate. La acestea se adaugă în ultima vreme evidențierea unor limfokine (M.I.F., L.I.F) sau a altor funcții ale LT, ca citotoxicitate, transformare blastică etc.

O mare semnificație o are faptul că utilizarea acestor reacții imune de diagnostic indirect al unei infecții pot stabili atît diagnosticul în cazurile de boală infecțioasă, cît și formele inaparente clinic. Pentru evidențierea infecțiilor ce se produc în perioada fetală și perinatală, determinarea anticorpilor din clasa IgM este esențială (rubeolă, citomegalie, toxoplasmoză etc.).

Pe un alt plan, reacțiile imune și, în primul rînd, cele Ag—Ac, sînt de mare importanță în caracterizarea antigenică a microorganismelor și, ca urmare, în diagnosticul de laborator direct. Pentru infecțiile microbiene și, în special, pentru cele virale, cu ajutorul reacțiilor Ag—Ac de mare sensibilitate (imunoelectronomicroscopie, imunoprecipitare în gel și cele cu marcare fluorescentă, enzimatică sau radioactivă), se poate realiza un diagnostic direct, rapid prin evidențierea în produsul patologic a agenților etiologici sau a antigenelor specifice ale acestora.

2. **În scopuri epidemiologice,** reacțiile imune sînt mult folosite în stabilirea nivelului imunitar al unei populații față de un agent infecțios. Stabilirea acestui nivel este importantă în aprecierea eficienței imunizării active prin vaccinare, cunoscut fiind faptul că asigurarea unei proporții de peste 90% din populație cu prag eficient de apărare imunitară, întrerupe lanțul de transmisie al unei infecții și pe această cale se poate stabili eficiența unui program de imunizare prin vaccinare. Tot astfel se poate cerceta efectuarea corectă a acțiunilor de imunizare ale colectivității. Ținînd seama de acestea, reacțiile imunitare ușor de efectuat (ca de exemplu, reacția Shick) permit o apreciere a nivelului imunitar al populației sau a corectitudinii efectuării vaccinării antidifterice. Pentru condițiile epidemiologice din țara noastră se știe că depistarea prin reacția cu PPD a celor susceptibili (lipsiți de IMC) față de infecția tuberculoasă este urmată obligatoriu de vaccinarea cu B.C.G.

Reacțiile imune, mai ales cele Ag—Ac, sînt utile, de asemenea în stabilirea nivelului imunitar cîștigat prin infecție. Pe această bază se pot face prognoze privind posibilitatea apariției unei evoluții epidemice a unor infecții, în prezent, mai ales, de etiologie virală. Astfel, un titru

Scanned with OKEN Scanner

mediu de nivel coborît față de o variantă a virusului gripal sau a altui virus ce produce infecții respiratorii, ca virusurile paragripale, respirator sincițial, urlian etc., indică posibilitatea apariției unei epidemii cu unul din aceste virusuri.

3. **Alte aplicații medicale.** Reacțiile Ag—Ac pot fi folosite pentru determinarea cantitativă a hormonilor și a unor peptide biologic active, dovedindu-se superioare ca acurateță, sensibilitate și rapiditate, altor metode de testare. În cazul aprecierii cantitative a hormonilor, aceste testări aduc informații utile pentru caracterizarea bolilor endocrine. Prima oară s-a folosit radioimunotestarea insulinei, pentru ca ulterior, alți hormoni (ca ACTH, tireoglobina, parathormonul, calcitonina, hormonul de creștere, chorio-gonadotropina etc.), prin reacții de marcare enzimatică izotopică și alte reacții cu mare sensibilitate, să poată fi apreciați cantitativ. O reacție larg folosită este cea din diagnosticul de sarcină, în care printr-o reacție de inhibare a hemaglutinării, se evidențiază în urină chorio-gonadotropina. În mod similar, aceste reacții imune pot fi folosite pentru determinarea distribuției, remanenței și acumulării în organism a unor medicamente, inclusiv a chimioterapicelor.

4. **Deficiențele imunitare și apărarea antiinfecțioasă.** Importanța participării funcției imunitare în păstrarea homeostaziei reiese cu claritate și din așa-numitele „experiențe ale naturii". Acestea sînt reprezentate de deficite ale funcției imunitare, cu transmitere congenitală (genetică) sau mai rar, cîștigate (tabel 2.34). Totalitatea acestor deficiențe cunoscute de multe ori prin manifestările lor clinice majore, prin folosirea reacțiilor de laborator, se asociază cu infecții repetate, trenante și de severitate mare, care în lipsa unor procedee de suplinire a defectului imunitar, duc la deces. Se poate remarca, pentru defectele care interesează L.B. și I.U. asocierea cu infecții preponderent bacteriene, mai ales cu specii cu multiplicare extracelulară: stafilococ, streptococ, *Haemophilus influenzae,* b. piocianic, enterobacterii (boala Bruton, hipogamaglobulinemie etc.). În deficiențe ce interesează LT și IMC sînt frecvent întîlnite infecții cu microorganisme cu parazitism celular, cu preponderența infecțiilor virale sau a micozelor viscerale.

Funcția de apărare antiinfecțioasă este afectată și de deficite ale fagocitozei și SC. Astfel, boala granulomatoasă cronică, afecțiune cu transmitere recesivă legată de sex, se manifestă din primele luni de viață prin infecții repetate cu focare piogene, cutanate, ganglionare, pulmonare și hepatice. Histologic se observă leziuni granulomatoase. Leucocitele au funcția de înglobare a microorganismelor, dar activitatea lor bactericidă este mult diminuată datorită unui defect al NADH-oxidazei leucocitare. Diverse forme de neutropenii, ca și deficitele splenice congenitale, sînt de asemenea asociate cu o frecvență crescută a infecțiilor. Pentru aproape toate componentele SC au fost descrise defecte, unele însă foarte rar întîlnite sau neînsoțite de manifestări clinice. Există și manifestări care îndreaptă atenția spre un anumit defect, cum este de exemplu, edemul angio-neurotic ereditar, însoțit de defectul ce interesează C_{1s} — inactivatorul.

Posibilitatea apariției acestor defecte este semnalată clinic de frecvența mare a infecțiilor repetate și sînt depistate prin utilizarea testelor de explorare a funcției imunitare, a celei fagocitare, precum și a SC. În acest scop se vor selecta reacții care se adresează specific IU (reacții

Scanned with OKEN Scanner

Principalele deficite imunitare limfocitare primitive *Tabel 2.34*

Tipul de deficit imunitar	Linia celulară afectată	Deficitul principal	Transmitere	Manifestări clinice
Agamaglobulinemie legată de sex (boala Bruton)	L.B, plasmocit	Hipogamaglobulinemie accentuată, absenţa IgA salivare	Recesivă, legată de cromozomul X ; frecvenţa la băieţi 1 : 100000	Infecţii bacteriene repetate la 6—12 luni cu stafilococ, streptococ, *H. influenzae*. Frecvent asociat cu bronhopneumonie, cu bronşiectazie, poliartrită reumatoidă.
Hipogamaglobulinemii congenitale sau cîştigate	L. B, diferenţierea LB în plasmocite, cu asociere în grade variabile a deficitului L. T.	Titruri joase de Ig, alterări în comutarea de la LB la plasmocit	Defect congenital sau cîştigat	De obicei la 2—3 ani, infecţii frecvente şi severe, bronşiectazii ; se asociază complicaţii autoimune ; moarte frecventă.
Deficit în IgA	L. B, comutare la linia care sintetizează IgA		Frecvenţa (după vîrsta de 3 ani) este de 1 : 1000, cu apariţie sporadică sau concentrare familială, asociată uneori cu o deleţie în cromozomul 18	Asimptomatică sau sesizabilă prin infecţii rinofaringiene, bronşice sau intestinale, repetate şi trenante.
Sindromul Di George	L. T. (absenţa timusului şi paratiroidelor prin afectarea arcurilor branhiale 3 şi 4)	Deficit în I. M. C ; lipsa răspunsului la stimulare cu PHA şi Con A	Congenitală	Crize convulsive hipocalcemice ; infecţii severe cu microorganisme, cu parazitism celular. Moarte
Sindromul Hong şi Good	L. T, cu hipoplazia timusului şi a paratiroidelor	Limfopenie ; răspuns de I.M.C. diminuat.	Congenitală	Aceleaşi manifestări cu frecvenţă şi severitatea mai reduse
Sindromul Neselof (displazia timică cu Ig normale)	L. T, hipoplazie timică	Lipsa reacţiilor de I.M.C. ; absenţa probabilă a colonizării organelor limfoide periferice cu L.T.	Autozomală, recesivă	Infecţii grave, diaree cronică, lipsa creşterii în greutate în primele trei luni de viaţă
Hipoplazia hematopoetică globală (disginezie reticulară)	L. T., L. B., linia granulocitară ; probabil, oprirea diferenţierii celulei sursă	Limfocitoză şi aleucocitoză ; afectarea răspunsului imun şi a fagocitozei	Congenitală, rară	Infecţii foarte severe, hemoragii ; moarte în cîteva zile de la naştere.
Limfocitoftizia lui Glanzman şi Riniker (alimfocitoză şi agamaglobulinemie)	L. T şi L. B.	Reacţiile de I.M.C. abolite, absenţa L.T. şi LB în sîngele periferic, nivel coborît de Ig	Autozomală, recesivă	În primele luni de viaţă infecţii repetate, severe, oprirea creşterii în greutate ; constant diaree. Moarte
Alimfoplazia timică	LT şi LB	Agama sau hipogamaglobulinemie, absenţa reacţiilor de I.M.C.	Legată de cromozomul X	Manifestări mai puţin severe ca în cea precedentă, dar totodeauna mortală.
Deficit imunitar combinat cu asocierea adenozindezaminazei	L. T. preponderent, dar şi L. B.	Absenţa activităţii adenozindezaminazei în hematii şi leucocite	Autozomală, recesivă	Clinic similară cu precedentele, cu frecvente anomalii osoase.
Sindromul Wiskott—Aldrich	L. B ; probabil afectarea intervenţiei macrofagului	Titru scăzut de IgM ; răspuns de nivel coborît faţă de Ag polizaharidice	Recesivă, legată de sex	Hemoragii, purpură trombocitară, eczemă cronică, infecţii bacteriene, virale şi fungice, diaree sanguinolentă, moarte pînă la 10 ani.

Scanned with OKEN Scanner

Ag—Ac, electroforeza, imunoelectroforeza) sau I.M.C. (reacţii de H.T., M.I.F., reacţia limfocitară mixtă, răspuns la P.H.A. şi Con. A etc.). Este important ca prin teste adecvate să se stabilească celula afectată şi, pe cît posibil, mecanismul ce stă la baza defectului. În acelaşi scop reacţiile din sindromul umoral al inflamaţiei, leucocitoza, capacitatea bactericidă şi testul NBT au în clinică o utilizare de rutină.

2.7.3. IMUNITATEA ANTITUMORALĂ

Pe celula transformată tumoral, alături de antigenele de histocompatibilitate caracteristice gazdei, apar neoantigene tumorale răspunzătoare de inducerea unui răspuns imun. Aceste neoantigene sînt, de obicei, glicoproteine din membrana celulei tumorale şi sînt numite TSTA (Tumor Specific Transplantion Antigens). Ele sînt răspunzătoare la animale izologe de respingerea unei tumori printr-o imunizare prealabilă. Pot fi *individuale,* caracteristice unei tumori induse la un anumit animal printr-o substanţă chimică sau *comune* pentru tumorile induse de acelaşi virus. În afară de aceste antigene, în celulele transformate tumoral de unele virusuri apar şi antigene endocelulare — antigene T. În cursul evoluţiei unor tumori, pot să fie prezente în organism antigene embrionare, care în mod normal se produc în anumite perioade ale vieţii fetale. Alfa-fetoproteina se detectează, în hepatocarcinoame primare, dar şi în alte condiţii, ca de exemplu, hepatitele virale. Antigenul carcinoembrionar (care se găseşte în intestinul fetal) a fost evidenţiat, mai ales, în cancerul de colon, la titre mari în perioada metastazării, dar este prezent şi în alte afecţiuni, inclusiv la fumători. De aceea, detectarea acestor antigene trebuie analizată critic în textura examenului clinic.

Faţă de antigenele tumorale se declanşează o imunitate umorală. Transferul anticorpilor la un animal nu are un efect de apărare faţă de transplantarea unei tumori. Cel puţin, în aceste condiţii experimentale, anticorpii au efect *facilitant,* favorizînd creşterea tumorii prin interferenţă cu mecanismele I.M.C.

L.T. are rolul principal (demonstrat experimental), în apărarea antitumorală, în primul rînd, de recunoaştere a antigenelor tumorale şi deci a non-selfului. Instalarea I.M.C. prin LT citotoxic şi macrofagul activat, posibilă fiind şi intervenţia L killer natural, îndepărtează din organism celulele transformate tumoral sau clonele dezvoltate din acestea, realizînd funcţia de *supraveghere imună.*

Evadarea de sub acest control imunitar se datoreşte mai multor condiţii: antigene tumorale slabe, poziţii de dezvoltare privilegiate, factori blocanţi reprezentaţi de complexe Ag—Ac tumorale sau chiar Ag tumorale libere etc. În consecinţă se dezvoltă tumoarea, care ea însăşi poate avea efecte imunosupresoare. De aceea, imunoterapia specifică prin vaccinare sau ser imun se găseşte încă în imposibilitatea de a controla efectele nefavorabile, neutilizîndu-se la om. Rezultatele obţinute prin imunostimulare nespecifică — administrare de BCG, *Corynebacterium parvum,* cu intervenţia macrofagului activat sau înarmat, sînt de multe ori neconcludente.

Scanned with OKEN Scanner

2.7.4. IMUNITATEA DE TRANSPLANT

Transplantele de țesuturi și organe de la un receptor la un donator, în scop terapeutic, au constituit de mult timp o preocupare medicală. Inițial au fost denumite *grefe* fragmentele de țesuturi transferate unui receptor și *transplante* organele utilizate în același scop. În terminologia actuală cele două noțiuni sînt folosite de cei mai mulți autori ca sinonime și se referă la implantarea chirurgicală a unui țesut sau organ.

Rezultatele pozitive obținute mai ales, în transplantele de piele și rinichi au fost însoțite de multe insuccese. Ele se datoresc unui răspuns imun al receptorului față de antigenele HLA, prezente pe hematii, limfocite și numeroase celule tisulare. Este cunoscut faptul că aceste antigene variază de la o specie la alta, ca și de la un individ la altul. Ținînd cont de aceste considerente s-a creat o nomenclatură a țesuturilor transferate bazată, în primul rînd, pe asemănarea sau deosebirea genetică dintre donator și receptor (tabel 2.35). Transplantarea țesuturilor autogenice și singenice reușește datorită similitudinii antigenelor HLA. În

Tabel 2.35

Denumirea tipurilor și țesuturilor de transplant

Tipul de transplant	Tipul de țesut	Termenul vechi	Relații genetice și antigenice ale transplantului
Autografă	Autogeni	Autolog	Țesuturi provenite de la același individ
Singrefă	Singenic, congenic	Izolog	Țesuturi provenite de la gemeni monovitelini
Allografă	Allogenic	Omolog	Țesuturi provenite de la persoane de aceeași specie
Xenografă	Xenogenic	Heterolog	Țesuturi provenite de la indivizi din alte specii

schimb, cele allogenice și xenogenice sînt de obicei respinse, chiar după terapia imunosupresivă. Respingerea grefei se poate manifesta sub mai multe forme dintre care citățm:

1. Accidentele postransfuzionale datorate incompatibilității de grupe sanguine.
2. Reacția supraacută de respingere este dominată de imunitatea umorală și cauzată mai ales de Ac circulanți prezenți la receptori. Pe celulele donate se formează complexe Ac—Ag cu activarea SC. Dacă citoliza nu are loc imediat (cîteva zile), Ig acționează ca opsonine, favorizînd fagocitarea celulelor transferate. Apare mai ales în imunoincompatibilitatea sistemului AB0.
3. Respingerea primară se produce, de obicei, la receptorul nesensibilizat, cu o evoluție mai lentă. În primele zile nu apar indicii că grefa va fi eliminată. După 10—12 zile apare febra, se pierd funcțiile și se înregistrează rejecția transplantului. Este un proces datorat I.M.C. prin citotoxicitate sau limfokine. Histologic se observă o infiltrație masivă de limfocite, macrofage și plasmocite.
4. Respingerea secundară. Dacă o grefă de același fel (donator-receptor) se repetă, fenomenele sînt asemănătoare celor din respingerea primară, dar cu o evoluție mai rapidă (cîteva zile), datorită sensibilizării

Scanned with OKEN Scanner

organismului receptor față de Ag donatorului. Intervenția limfocitelor T (celule cu memorie) ca și a macrofagelor duce la eliminarea rapidă a grefei.

În chirurgia de transplant reușita este condiționată de selectarea donatorilor a căror organe trebuie să fie cît mai apropiate din punct de vedere al antigenelor HLA de cele ale receptorului, selectarea făcîndu-se pe baza testării prin metode de laborator. Manipularea transplantelor este asigurată de un control imunitar permanent și utilizarea în acest scop a terapiei imunosupresoare.

2.7.5. IMUNITATE ȘI IMUNOPATOLOGIE

Imunitatea s-a dezvoltat ca funcție homeostatică pentru apărare, în prim plan antiinfecțioasă. Ca orice funcție homeostatică, în anumite condiții, instalarea răspunsului imun poate să aibă efecte nefavorabile, adverse, care constituie marele capitol, în continuă dezvoltare pe planul cunoașterii, al *Imunopatologiei,* manifestări ce vor fi studiate la fiziopatologie și disciplinele clinice.

Faptul că patologia prin complexe imune (tip 3) a cîștigat o mare importanță și a devenit posibilă o evidențiere a acestor complexe, fie circulante, fie sub formă de depozite în țesuturi, prin tehnici de laborator, face necesară o revenire. Multe din aceste manifestări au ca model cel realizat în 1903 și cunoscut ca *reacția Arthus* (RA) în care procesele imunologice au fost cunoscute numai în ultima vreme. În această reacție, anticorpii circulanți care difuzează în țesuturi, dacă întîlnesc antigenul, declanșează în anumite condiții o reacție inflamatorie. În RA antigenul se inoculează intradermic într-un volum mic. Dacă Ig anticorpi cu care reacționează Ag sînt precipitanți și fixează C, se declanșează o RA. La 1—2 ore după inocularea antigenului apare reacția inflamatorie locală, cu edem, eritem și apoi hemoragii petesiale. Anticorpii pot fi transferați pasiv, putînd proveni și de la o altă specie. O condiție esențială este de *ordin cantitativ:* sînt necesare cantități de Ig de aproximativ 1000 ori mai mari decît cele care declanșează reacțiile atopice și cu cît titrul de anticorpi este mai mare, cu atît reacția locală are o evoluție mai gravă. Formarea complexelor Ag—Ac activează C, rezultînd fragmentele biologic active C_{3a} și C_{5a}, cu funcțiile cunoscute de anafilatoxină și chimiotactice (C_{5a} și C_{567}), care controlează procesele inflamatorii și, în primul rînd, afluxul plachetar și leucocitar. Din trombocite se eliberează amine vasoactive. Prezența P.M.N. este indispensabilă, deoarece în urma fagocitării complexelor Ag—Ac se pun în libertate hidrolazele lizozomale, producîndu-se arii de necroză în pereții vasculari și ajungîndu-se la o vascularită degenerativă necrozantă.

Mecanisme asemănătoare cu RA se întîlnesc în unele afecțiuni umane:

— *boala serului* apare la 6—8 zile după administrarea prima oară a unui ser heterolog și este însoțită de febră, erupție de tipul urticarian, artrite etc. Inocularea unei cantități mari de Ag inițiază sinteza de Ac, formîndu-se apoi complexe imune care activează C și declanșează procese inflamatorii consecutive;

— *boala plămînului de fermier* sau *alveolita alergică.* Muncitorul se sensibilizează la antigenele unor microorganisme, mai ales, termofile care

Scanned with OKEN Scanner

se dezvoltă vara în fînul cosit *(Thermopolyspora polyspora)* sau în gunoaie compostate *(Thermoactinomyces vulgaris, Micropolyspora faeni)*. La un nou contact cu antigenul, ca de exemplu, în cursul iernii cînd se distribuie fînul animalelor, apare o capilaro-alveolită, care în lipsa unei conduite terapeutice şi profilactice adecvate, duce la fibroză pulmonară. Complexele imune au un rol evident şi important în declanşarea mecanismelor de autoimunitate.

Făcînd o apreciere generală, se poate reliefa că o caracterizare a bolii imune în raport de tipurile de hipersensibilitate are de multe ori un caracter arbitrar. Astfel, în boala serului s-a constatat că, alături de leziuni declanşate de complexe Ag—Ac, apar şi fenomene care se găsesc în anafilaxie. Apoi, boala plămînului de fermier este plasată în mod obişnuit în entităţile caracteristice RA. Există însă date care argumentează pentru o contribuţie semnificativă în această boală a fenomenelor de HT. Pe de altă parte evidenţierea complexelor imune circulante nu reprezintă un argument hotărîtor pentru intervenţia lor patogenetică. Pare mai degrabă probabil ca *în multe stări imunopatologice să concure mecanisme complexe, cu rol sinergic, în diferite etape de evoluţie unul sau altul din acestea căpătînd o importanţă preponderentă.*

Între stările de hipersensibilitate un loc important îl ocupă cele de *origine medicamentoasă*. Prin molecula lor de obicei mică, ele nu sînt imunogene, dar pot căpăta această proprietate prin ataşarea lor sau a unor compuşi rezultaţi din metabolizare, ca haptene, de proteinele proprii ale organismului, devenind astfel structuri non-self. De cele mai multe ori este foarte dificil a diferenţia reacţiile imunitare de alte efecte adverse, secundare ale medicamentelor, cum sînt cele toxice, de idiosincrazie ş.a.

Manifestările clinice sînt variate (tabel 2.36), cu manifestări anafilactice, dermice, hematologice, hepatice şi renale. În tabelul 2.37 sînt trecute principalele medicamente ce determină afectarea hematologică.

Bolile autoimune sînt rezultatul unui răspuns de I.U. şi/sau I.M.C. faţă de structuri antigenice proprii. Apariţia unui R.I. faţă de structuri

Tabel 2.36

Manifestări principale ale hipersensibilităţii medicamentoase

Şoc anafilactic
Boala serului
Febră
Erupţii cutanate
— Urticarie
— Angioedem
— Eritemul multiform
— Prurit
— Dermitita alergică de contact
— Purpură
— Erupţie rujeoliformă, eritematoasă exfoliativă
Anomalii hematologice
— Anemia hemolitică
— Leucopenii
— Trombocitopenii
— Eozinofilii
Colestază hepatică
Nefrită acută interstiţială

Tabel 2.37

Medicamente care pot declanșa afectări hematologice

Trombopenii	Leucopenii	Hemoliză
Chinină		Chinină
Chinidină		Chinidină
Antazolină	Antazolină	Antazolină
PAS	PAS	PAS
Sulfamide	Sulfamide	Sulfamide
Piramidon	Piramidon	Piramidon
Novobiocină		
	Antitiroidiene sintetice	
Digitoxid		
		Fenacetină
Hidrazidă		Hidrazidă
Difenilhidantoină		
		Penicilină
Fenotiazină	Fenotiazină	
Săruri de aur		
Aspirină		
		Stibofen
Stibofen		

proprii poate fi considerată ca un proces normal destinat eliminării selfului alterat, dar poate cîștiga un caracter patologic printr-o dezvoltare de mare amploare, prin persistența sa și prin natura particulară a unor antigene. Unele din aceste antigene sînt de tipul Ag sechestrate (cristalin, spermă, SNC etc.), care în condiții speciale pot ajunge în contact cu sistemul limfoid și pot declanșa reacții autoimune. În general, bolile autoimune sînt însoțite de prezența anticorpilor față de antigene specifice de organ, de organite celulare sau de produși de secreție celulară. Pentru evidențierea anticorpilor se utilizează reacții Ag—Ac, în special imunofluorescența, radioimunotestarea, apoi RFC, hemaglutinarea pasivă etc. S-au descris Ac antitiroidă în tiroidită, antimușchi striați în miastenie și cardita reumatismală ș.a., antileucocitari în leucopenii, antitrombocitari în trombocitopenii, antinucleari în lupus eritematos, anti-Ig (factor reumatoid) în poliartrita reumatoidă etc. Prezența anticorpilor nu este o dovadă certă pentru diagnosticul unei boli imune și nici un argument decisiv în sprijinul lor patogenetic. Apoi, în multe din aceste boli, pot fi întîlnite reacții de I.M.C., inclusiv reacții de H.T. Principalele boli autoimune sînt trecute în tabelul 2.38 și s-au împărțit în două categorii: pluriviscerale sau sistemice și restrînse la un singur organ sau țesut particular.

În multe boli considerate autoimune s-a putut dovedi intervenția factorului infecțios cel puțin cu rol de inițiere a proceselor imune. Pentru glomerulonefrită acest fapt reiese din tabelul 2.39, din care se observă că numai 5% sînt glomerulonefrite cu anticorpi față de bazala glomerulară, cele mai multe din acestea fiind conexe factorului infecțios. Apoi, hepatita cronică evolutivă trebuie legată de persistența antigenelor virusului hepatitei B. Reumatismul acut este în legătură evidentă cu infecția streptococică, chiar dacă prezența anticorpilor îl plasează în cadrul bolilor autoimune. Experimental s-a demonstrat că în multe boli autoimune pot fi evidențiați anticorpi față de acizi nucleici virali, multe din acestea putînd fi corelate cu infecția persistentă cu virusuri din fa-

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 2.38

Principalele boli autoimune

I. Pluriviscerale sau sistemice

Lupus eritematos diseminat
Poliartrita reumatoidă
Sclerodermia
Fibroza pulmonară interstiţială difuză idiopatică
Ciroza biliară primitivă
Hepatita cronică activă
Unele diabete
Sindromul Gougerot—Sjögren

II. Atingerea unui organ sau sistem particular

Organul sau sistemul	Manifestarea clinică
Tiroida	Tiroidita Hashimoto şi mixedemul primitiv
	Boala Basedow
Paratiroida	Hipoparatiroidii primitive
Stomacul	Anemia Biermer
Ochii	Uveite, oftalmia simpatică
Muşchii	Miastenia gravis
Inima	Cardita reumatismală
Pielea	Pemfigus, dermatita herpetiformă
Rinichii	Glomerulonefrita cu anti-bazală glomerulară
Spermatozoizii	Unele sterilităţi
S.N.C.	Encefalita după vaccinări antirabice

Tabel 2.39

Relaţii cu factorul infecţios în glomerulonefrite

Glomerulonefrite cu anticorpi anti-bazală glomerulară (5% din total)
Glomerulonefrite acute şi subacute poststreptococice
Glomerulonefrite şi sindrom nefrotic în infecţia malarică
Glomerulonefrite asociate endocarditei infecţioase
Glomerulonefrite din hepatite cu virus B
Glomerulonefrite din sifilisul secundar
Sindrom nefrotic indus prin tratament cu penicilamina
Glomerulonefrite din boala serului sau în complicaţii ale vaccinărilor

milia *Retroviridae*. Se poate deci presupune că cel puţin în unele boli imune, factorul infecţios modifică antigenic structurile proprii, aşa că faţă de ele se declanşează răspuns imun, sau anticorpii antimicrobieni, prin reacţii încrucişate cu antigenele organismului gazdă, declanşează o reacţie imunitară. Apoi, prin intervenţia unor antigene microbiene cu înrudire parţială cu cele proprii se poate rupe toleranţa faţă de self. Aceste boli se întîlnesc la subiecţi cu dezechilibre funcţionale imunitare. Se poate presupune că infecţia constituie un moment important de instalare a unor astfel de stări şi, mai ales, poate să inducă o *dereglare în reţeaua complexă de modulare a răspunsului imun*. Devine astfel posibil ca, o parte din bolile considerate ca autoimune, să fie în realitate boli de *autoagresiune*, fiind iniţiate prin intervenţia factorului infecţios.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3
BACTERIOLOGIE SPECIALĂ

3.1. CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE ŞI TOXIINFECŢIA DIFTERICĂ

Bacilul difteric face parte din genul *Corynebacterium* care cuprinde bacterii grampozitive cu o largă distribuţie în natură, saprofite, unele specii comensale (difteromorfi), altele patogene pentru animale (tabel 3.1). Specia principală patogenă pentru om este *C. diphtheriae.* De multe ori celulele sînt deformate datorită corpusculilor Babeş-Ernst; au aşezare în forme de litere chinezeşti sau palisade, proprietăţile lor principale fiind trecute în tabelul 3.1.

Difteria ilustrează rolul cunoaşterii ştiinţifice a mecanismelor etiopatogenetice în organizarea programelor de combatere şi prevenire care a dus în multe ţări la o scădere considerabilă a morbidităţii. În această coordonată se înscriu şi rezultatele obţinute la noi, considerate ca un mare succes al activităţii medicale, ţara noastră situîndu-se printre ţările cu cea mai mică morbiditate (fig. 3.1). Momentele importante în dezvoltarea înţelegerii difteriei se pot vedea în tabelul 3.2. Se desprinde din acest tabel că după descoperirea b. difteric, un moment important l-a constituit dovedirea rolului exotoxinei ca factor major de patogenitate, primele informaţii în acest sens fiind aduse de modelul experimental pe cobai. După ce pornind de la rolul toxinei, s-au pus la punct metode de seroterapie şi vaccinare cu anatoxină, după anii 1960, s-a descifrat şi mecanismul molecular al acţiunii toxinei.

F r e e m a n a stabilit că toxina este produsă numai în condiţii de conversie lizogenă, prin bacteriofagul β-tox şi alţi bacteriofagi temperaţi (capitolul „Genetică“ şi „Factori de patogenitate“). Bacteriofagul conţine în genomul său gena pentru sinteza proteinei-toxină, celula bacteriană fiind cea care controlează producţia de toxină, mai ales, prin cantitatea de fier din mediu (0,14 μg/ml mediu, producere maximă, iar la 0,5 μg/ml sinteza toxinei este diminuată pînă la abolire). S t r a u s s, P a p p e n h e i m e r şi alţii au arătat că toxina este constituită din două fragmente: *fragmentul B* favorizează ataşarea şi pătrunderea în celulă prin receptorii specifici, din membrana celulei; *fragmentul A* este componenta răspunzătoare de activitatea toxică, prin blocarea sintezei proteice din celulă, deoarece prin activitatea sa enzimatică ribozilează şi inactivează factorul de elongare EF_2. Rezultă moartea celulei.

Infecţia se manifestă la om ca o angină febrilă, cu exsudat bogat, formîndu-se pe faringe şi, mai ales, pe amigdale, o falsă membrană, aderentă, sîngerîndă la detaşare, de culoare alb-cenuşie. Este însoţită de semne generale de intoxicaţie şi afectarea mai multor organe: suferinţă miocardică, nervoasă (paralizia vălului palatin, polinevrită), hepatică, renală şi suprarenală.

Bacilul difteric pătrunde pe cale respiratorie şi se localizează în mucoasa faringiană, cu intervenţia posibilă a unor antigene de suprafaţă,

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.1

Genul *Corynebacterium:* reprezentanți și proprietăți principale

Specia	Producere de acid din					Lichefierea gelatinei	Producerea de hemoliză	Hidroliza ureei	Producerea de toxină	Specia animală pentru care este patogen (*P*) sau comensal (*C*)
	Glucoză	Maltoză	Zaharoză	Lactoză	Manitol					
C. diphtheriae	+	+	−	−	−	−	±	−	+	Om (*P*)
C. pseudodiphthericum	−	−	−	−	−	−	−	+	−	Om (*C*)
C. xerosis	+	+	+	−	−	−	−	−	−	Om (*C*)
*C. ulcerans**	+	+	−	−	−	+	+	+	+	Om (*P*) și alte mamifere
C. ovis	+	+	∓	∓	∓	∓	+	+	+	Oaie (*P*)
C. pyogenes	+	+	∓	+	−	−	+	−	+	Porc, oaie, bovidee (*P*)
C. equi	−	−	−	−	−	−	−	−	− ?	Cal (mînz) (*P*)
C. murium	+	+	+	−	+	−	−	?	+	Șoarece (*P*)

* Produce două tipuri de exotoxină: una identică cu cea de la *C. diphtheriae*, alta cu cea de la *C. ovis*.

Scanned with OKEN Scanner

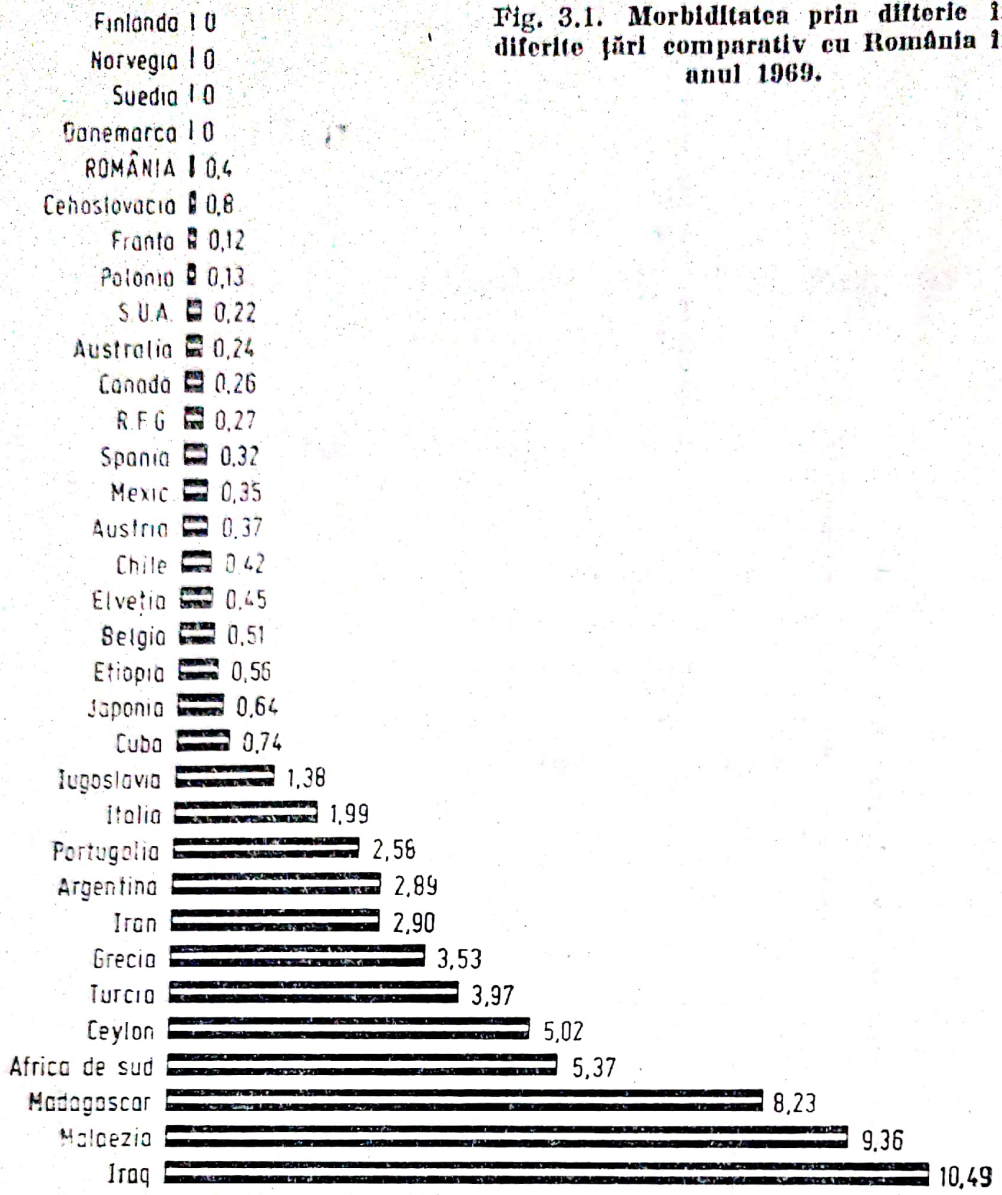


Fig. 3.1. Morbiditatea prin difterie în diferite țări comparativ cu România în anul 1969.

Tabel 3.2

Momente de bază în cunoașterea difteriei

1. Descoperirea și izolarea b. difteric: Klebbs — 1883, Löffler — 1884
2. Stabilirea rolului toxinei în producerea bolii: Roux și Yersin — 1888
3. Neutralizarea toxinei de serul imun antitoxină: Behring și Kitasato — 1890
4. Terapia cu ser imun: Behring — 1891, Roux și Nocard — 1893
5. Intradermoreacția: Schick — 1913
6. Obținerea anatoxinei: Ramon — 1923
7. Producerea toxinei prin conversie lizogenă: Freeman — 1951
8. Caracterizarea moleculară a toxinei și a mecanismului ei de acțiune: Strauss — Pappenheimer jr. — 1960.

între care o substanță asemănătoare cord factorului, trehalozo — corynemicolinat, se crede că are un rol important. Bacteriile pătrund în celule epiteliale, se multiplică și eliberează exotoxina, care duce la necrozarea celulelor învecinate, acestea servind la rîndul lor ca substrat de dezvoltare bacteriană. Prezența bacteriilor și necroza declanșează un

Scanned with OKEN Scanner

proces inflamator caracteristic, cu exsudare masivă plasmatică și celulară, ceea ce explică formarea falsei membrane. Aceasta constituie un substrat bun de dezvoltare a b. difteric și consecutiv eliberare de exotoxină. Bacteria rămîne cantonată la poarta de intrare, dar toxina difuzează prin circulația generală și determină semnele generale de infecție menționate.

Pornind de la rolul primordial al toxinei, s-a instaurat terapia cu ser imun, anticorpii antitoxici neutralizînd toxina. Aceasta se datorește atașării Ig de grupările determinante de pe fragmentul B, mascarea pozițiilor de atașare pe receptori și în felul acesta, împiedicarea pătrunderii toxinei în celulă. Față de toxina endocelulară, Ig sînt lipsite de acțiune, ceea ce arată necesitatea introducerii precoce a seroterapiei.

Pentru imunizarea activă și deci prevenirea infecției se poate acționa prin vaccinare cu anatoxină difterică, introdusă în programele de vaccinări după descoperirea acesteia de către R a m o n. La noi în țară se utilizează anatoxina purificată și adsorbită pe fosfat de aluminiu (ADPA), de obicei sub formă de bivaccin (anatoxină difterică și tetanică) sau trivaccin (diftero-tetanic-pertussis). Pentru împiedicarea multiplicării bacteriei și difuzării ei în colectivitate se folosesc antibiotice, penicilină și mai ales, eritromicină. Această terapie este folosită și pentru sterilizarea purtătorilor, depistați prin control periodic în colectivitățile de copii și adolescenți.

Pe aceste baze la noi în țară au fost organizate programe de combatere a difteriei, care au dus la o scădere remarcabilă a morbidității (fig. 3.2.).

*

In ultima vreme, alte *Corynebacterii* au atras atenția: 1. *C. minutissima,* agent etiologic al eritrasmei (considerată anterior ca produsă de fungi), cu apariția unei plăci cutanate solzoase, cu fluorescență roșie-coral în lumină U.V.; 2. *C. vaginale* (cunoscută înainte ca *Haemophilus vaginalis)* cu intervenție posibilă în uretrite, cu apariția unor celule epiteliale în care se găsesc caracteristic bacterii în grămezi; 3. *C. parvum,* anaerob, folosit pentru obținerea de preparate imunostimulante cu utilizare în terapia antitumorală.

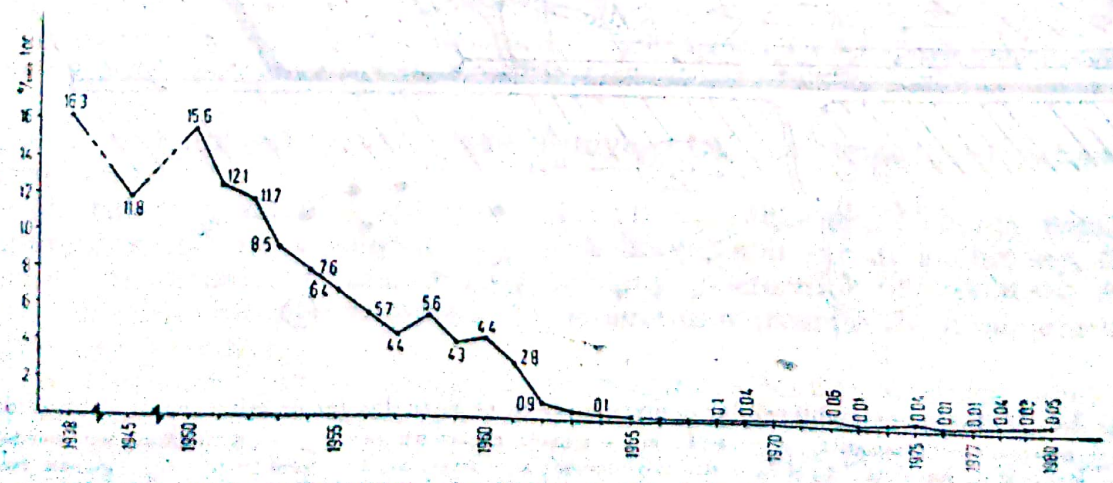


Fig. 3.2. Curba morbidității prin difterie în România în perioada 1938—1980.

Scanned with OKEN Scanner

3.2. GENUL MYCOBACTERIUM ŞI INFECŢIA TUBERCULOASĂ

Genul *Mycobacterium* face parte din familia *Mycobacteriaceae* şi cuprinde bacili acido şi alcoolo-rezistenţi, aerobi, imobili, nesporulaţi. Au o structură celulară de tip grampozitiv; în perete se adaugă straturi glico-lipidice complex organizate, responsabile de acido-rezistenţă şi de caracterul granulomatos al inflamaţiilor produse (fig. 3.3.).

Se distinge un număr mare de speci de mycobacterii: unele patogene strict adaptate la om, altele saprofite care trăiesc pe plante, în apă şi sol. Sînt patogene pentru om aproximativ 10 specii sau complexe de specii (tabelul 3.3), producînd îmbolnăviri cu evoluţie lentă, cu leziuni inflamatorii cronice granulomatoase, localizate superficial sau în organele interne: lepră, tuberculoză şi mycobacterioze. Imunitatea faţă de mycobacterii, germeni patogeni cu parazitism facultativ intracelular, este o imunitate mediată celular, care alături de protecţie participă şi la mecanismul de producere a leziunilor.

Speciile şi subspeciile genului sînt definite luînd în considerare ansamblul proprietăţilor: morfotinctoriale, de cultură, biochimice, antigenice, de patogenitate, de sensibilitate la bacteriofagi, analiză cromatografică a componentelor celulare. Specii cu proprietăţi foarte apropiate sau tulpini cu proprietăţi intermediare sînt grupate în „complexe" de specii (de exemplu, complexul *M. avium — M. intracellulare).*

Cultivarea pe mediul Löwenstein-Jensen şi testele biochimice (tabel 3.4) permit separarea bacililor tuberculozei de speciile mycobacteriilor netuberculoase (denumite şi „atipice" sau „anonime") şi încadrarea aces-

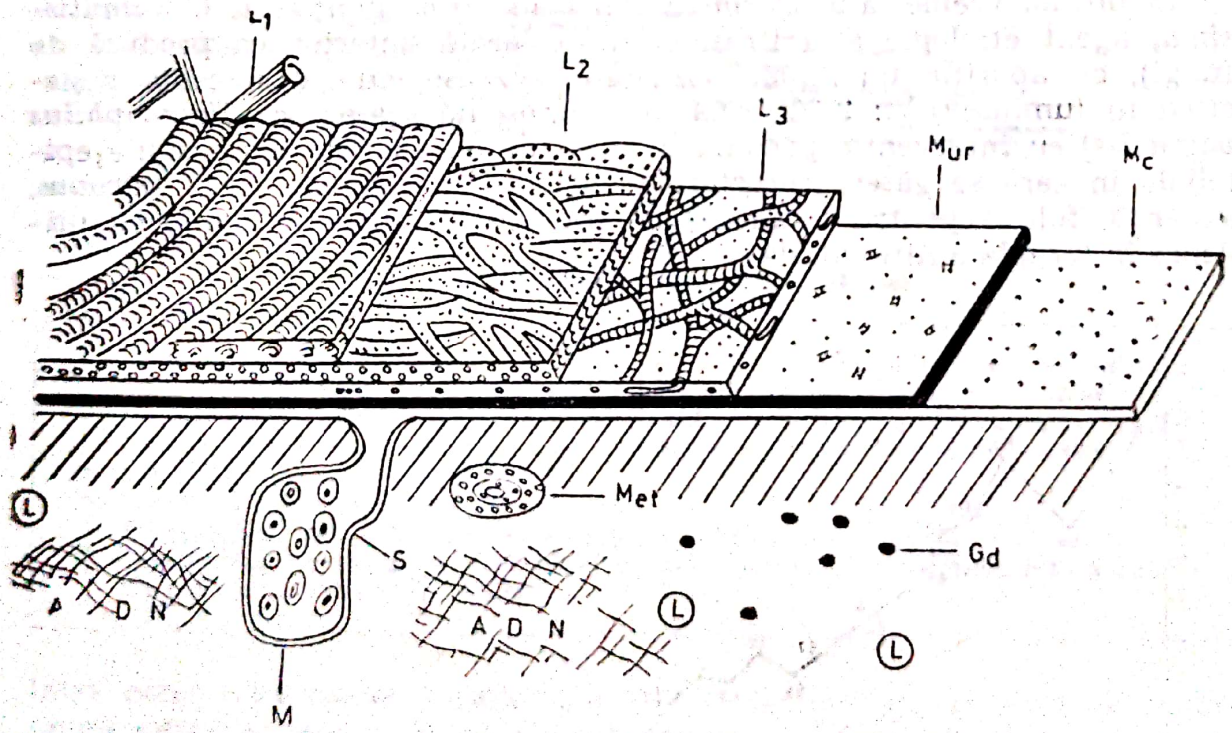


Fig. 3.3. Diagrama peretelui celular la mycobacterii, pe baza datelor de microscopie electronică: M_c — membrană citoplasmatică; S — sept; M_{gl} — granule metacromatice; M_{ur} — peptidoglican sau mureină; L_g — glicolipid de suprafaţă; L_1 şi L_2 — structuri fibroase; M — mezozom; L — corpi lipoizi; G_d — granule dense [(după Barksdale L. şi Kim K.S.).

Tabel 3.3

Principalele specii de micobacterii (Mycobacterium)

Grup*	Specii	Rol în patologie
	M. tuberculosis *M. bovis* *M. africanum* (rar)	Produc tuberculoză la om; contagiu inter-uman sau de la bovine; infecţia urmată de persistenţa în organism
	M. ulcerans	Leziuni cutanate
	M. leprae	Rezistenţa la infecţie şi forma clinică de boală sînt determinate de starea imunităţii mediate celular; nu se dezvoltă pe medii de cultură.
	Micobacterii netuberculoase (boli = micobacterioze)	
I. Foto-cromogeni	*M. kansasii* *M. marinum* *M. simiae* şi *M. asiaticum*	Localizări şi patogenie asemănătoare cu *M. tuberculosis* Leziuni cutanate Rar întîlnite în patologie
II. Scoto-cromogeni	*M. scrofulaceum* *M. szulgai* *M. xenopi*	Mai ales adenită cervicală la copii; în cavitatea bucală se găsesc uneori şi speciile nepatogene: *M. gordonae* şi *M. flavescens*
III. Necromogeni	Complexul *M. avium-intracellulare* *M. malmoense* şi *M. haemophilum* Complexul *M. terrae*	Localizări şi patogenie asemănătoare cu *M. tuberculosis* Rar întîlnite Specii nepatogene
IV. Cu creştere rapidă	Complexul *M. fortuitum-chelonei* *M. smegmatis*, *M. phlei* etc.	Rar întîlnite în patologie; se dezvoltă pe medii uzuale. Majoritatea speciilor din grup sînt nepatogene
Patogene pentru animale	*M. lepraemurium*, *M. microti*, *M. paratuberculosis*, *M. farcinogenes*, *M. senegalense*	

* Grupele Runyon (I—IV) de mycobacterii netuberculoase stabilite după timpul de dezvoltare şi pigmentogeneza pe mediul Löwenstein—Jensen şi caractere biochimice

tora în una din cele patru grupe Runyon. Cei mai importanţi patogeni umani sînt:

— *M. tuberculosis* (descoperit de Koch în 1882) şi *M. bovis* produc tuberculoză la om; contagiul este inter-uman, mai rar de la bovine; infecţia este urmată, de obicei, de *persistenţa bacteriilor în organism;* detectabilă prin intradermoreacţia cu tuberculină (reacţie de hipersensibilitate de tip tardiv);

— *M. leprae* nu cultivă pe medii. Se multiplică lent în periniţa labei la şoarece sau prin infectarea unor specii de reptile. Forma clinică de lepră este determinată de starea imunităţii celulare care poate fi *puternică* în forma tuberculoidă, *cu puţine bacterii* în leziuni, bolnavii avînd o contagiozitate redusă sau *poate lipsi* în forma lepromatoasă, în care

Scanned with OKEN Scanner

leziunile conţin macrofage pline cu bacili (globi lepromatoşi), iar bolnavul este contagios.

Celelalte mycobacterii produc, în general, leziuni superficiale sau localizate în ganglionii limfatici regionali (de exemplu, adenită cervicală). Aceste specii cu virulenţă scăzută, ca şi speciile nepatogene, pot fi ocazional contaminante, prezente în cavitatea bucală, sucul gastric sau alte produse, inclusiv sputa unui bolnav de tuberculoză (ceea ce pune probleme dificile de diagnostic). Menţionăm însă rolul cert în patologie al *M. kansasii* şi *M. avium* intracelulare (tabelul 3.4).

Tabel 3.4

Principalele proprietăţi de diferenţiere ale mycobacteriilor

Grup	Specia	Temperatura optimă de cultivare[1]	Dezvoltarea culturii[2]	Colonii	Pigmentare[3]	Teste biochimice		
						Producere niacină	Catalază termorezistentă (68°C)	Nitratreductază
	M. tuberculosis	30°	1	R	—	+	—	+
	M. bovis		1	R	—	—	—	—
	M. ulcerans		1	R	—	+	—	+
I.	*M. kansasii*	24—30°	1	R/S	+	—	+	+
	M. marinum		1	S/R	+	—	+	—
II.	*M. scrofulaceum*		1	S	+	—	+	—
III.	*M. avium — M. intracellulare*		1	S/R	—	—	+	—
IV.	*M. fortuitum*		r	S/R	—	—	+	+

[1] Toate speciile se dezvoltă la 37°C, cu excepţia celor la care se menţionează o altă temperatură.

[2] Pe mediul Löwenstein—Jensen: 1 = lentă, peste două săptămîni; r = rapidă, 1—7 zile (grup Runyon IV).

[3] Grup Runyon I pigmentează numai după fotoinducţie; grup II pigmentează atît la întuneric cît şi la lumină.

Infecţia tuberculoasă este un exemplu tipic de implicare a imunităţii mediată celular în patogenia şi rezistenţa antiinfecţioasă. Modelul experimental l-a constituit, ca şi pentru difterie, infecţia la cobai, permiţînd stabilirea noţiunilor de bază în înţelegerea infecţiei şi imunităţii.

Inocularea se face subcutanat, în regiunea inghinală. La locul inoculării apare după 10—14 zile un nodul care se ulcerează (şancru de inoculare) şi din care se elimină un puroi cazeos. Pe cale limfatică, bacilul se răspîndeşte în organism şi animalul moare după cîteva săptămîni. Reinfectarea cu b. tuberculozei a unui cobai infectat anterior face ca leziunea să evolueze diferit — fenomenul lui Koch. Dacă după apariţia primei leziuni se inoculează bacili în cealaltă regiune inghinală, al

Scanned with OKEN Scanner

doilea nodul apare mult mai repede (2—3 zile), ulceraţia se vindecă prin eliminarea ţesutului necrozat şi a bacililor, iar infecţia nu mai ajunge la ganglionii regionali. Cu toate acestea, prima leziune şi boala generalizată îşi urmează cursul obişnuit. Cea de a doua reacţie inflamatorie poate fi provocată şi cu bacili omorîţi sau substanţe extrase din bacterie (tuberculină). Fenomenul este interpretat ca apariţie în organismul infectat a unei hipersensibilităţi faţă de antigenele b. tuberculozei (reacţia inflamatorie apare la 2—3 zile în loc de două săptămîni) şi *în paralel* a unei imunităţi antiinfecţioase (multiplicarea agentului infecţios este localizată, fără prinderea ganglionilor şi diseminare; ulceraţia se vindecă cu eliminarea bacililor). Această asociere a hipersensibilităţii de tip tardiv şi a imunităţii a rămas o constantă în înţelegerea infecţiei tuberculoase şi în conduita practică în probleme de tuberculoză. Totodată s-a evidenţiat o particularitate a acestei imunităţi — în acelaşi organism pot coexista leziuni care se agravează, alături de altele care se vindecă.

Urmărirea infecţiei naturale la om a arătat că bacilul tuberculozei are o patogenitate redusă pentru specia umană. Poate că mai mult decît pentru oricare alt agent infecţios este important să se deosebească infecţia cu *M. tuberculosis*, de boala infecţioasă — tuberculoza. Ca regulă generală, prima infecţie este inaparentă. Ea este urmată însă de persistenţa bacililor în organism. Aceasta determină instalarea unei hipersensibilităţi de tip tardiv faţă de antigene ale bacilului (apare după aproximativ 40 zile şi se evidenţiază prin intradermoreacţie cu proteine purificate din tuberculină — PPD) şi imunitate faţă de reinfecţie, numită şi *premuniţie*. Uneori prima infecţie evoluează spre boală. Reinfecţii ulterioare sînt rezolvate rapid şi sînt, în general, inaparente. O reinfecţie masivă din afară (exogenă) sau reactivarea bacilului din organism (reinfecţie endogenă) evoluează ca boală — tuberculoza.

În marea majoritate a cazurilor poarta de intrare este respiratorie — bacteriile pătrund şi se multiplică în ţesutul pulmonar, ajungînd eventual pînă în ganglionii limfatici mediastinali. Leziunile pe care le produc sînt de două tipuri: *exsudative* şi *productive*.

Leziunea exsudativă în alveolele pulmonare este o reacţie inflamatorie obişnuită, cu exsudat lichid şi predominanţă a neutrofilelor polimorfonucleare. Leziunea exsudativă se poate resorbi complet cu distrugerea bacililor, poate duce la necroza ţesuturilor cu extindere sau poate trece într-o leziune de tip productiv.

Leziunea productivă (foliculul tuberculos) — reacţie inflamatorie cronică de tip granulomatos — se dezvoltă după instalarea imunităţii celulare. Este organizată într-o zonă centrală cu necroză cazeoasă şi bacili, înconjurată de o primă centură de celule gigante, multinucleate, conţinînd bacili (celule Langhans) şi celule epitelioide cu citoplasma mai clară, şi o a doua centură de limfocite, monocite şi fibroblaste. Celulele gigante şi epitelioide sînt macrofage activate local. Distrugerea bacililor în macrofage permite evoluţia spre vindecare, cu fibrozarea ţesutului, şi eventual depunerea sărurilor de calciu. Substanţele greu digerabile enzimatic din compoziţia bacilului şi ţesutul cazeos provoacă reacţie inflamatorie de corp străin, cu fibrozare-calcificare, reacţie numită granulomatoasă. Cîţiva bacili sînt sechestraţi în zona necrotică, unde rămîn pentru tot restul vieţii. Leziunile pulmonare şi din ganglionii mediostinali calcificaţi pot fi decelate radiologic ca marcă a primoinfecţiei şi formează complexul primar. Depăşirea capacităţii de fagocitare duce la multiplicarea bacililor, antrenarea ţesutului din jur în reacţia inflamatorie, cu

Scanned with OKEN Scanner

extinderea zonei necrotice, eventual deschiderea acestor focare în arborele respirator sau circulație și diseminarea bacilului în organism.

Aceste evenimente depind în ultimă instanță de capacitatea celulelor macrofagice de a îngloba și distruge *M. tuberculosis*.

Intră astfel în joc pe de o parte particularitățile biologice ale *M. tuberculosis*, cantitatea și virulența lor, iar pe de altă parte, determinismul genetic și starea fiziologică a rezistenței naturale și imunității celulare a organismului infectat.

Particularitățile biologice considerate cele mai importante sînt:

1 — multiplicarea lentă, aerobă, ce permite organismului să-și dezvolte răspunsul imun celular, cu mobilizarea și activarea macrofagelor la locul multiplicării;

2 — păstrarea viabilității luni și ani de zile în țesuturi în absența fagocitozei, ceea ce explică persistența (această păstrare a viabilității este evidentă pe mediile de cultură);

3 — constituția chimică aparte a mycobacteriilor prin cantitatea mare și varietatea substanțelor lipidice (20—40% din greutatea uscată, localizate, mai ales, în perete) ca și reacțiile biologice produse de aceste substanțe (tabel 3.5).

Tabel 3.5

Substanțe bacteriene cu rol în infecția tuberculoasă

Substanțe	Proprietăți
Proteine (prezente în PPD)	Principalele antigene față de care apar limfocitele T sensibilizate
Lipide (ceruri, glicozide etc.)	
— Cord factor	Toxic: inhibă migrarea polimorfonuclearelor *in vitro*; letal pentru șoarece (10 μg subcutanat)
— Sulfolipid	Probabil participă la virulență
— Ceara D	Stimulează răspunsul imun de tip celular față de proteinele bacteriene
— Fosfatide	Stimulează răspunsul inflamator de tip granulomatos, inclusiv necroză cazeoasă (doze mari)
Polizaharide	Rol necunoscut în patogeneză

* Ester de trehaloză cu acizi micolici; prezența în perete determină alipirea bacililor și creșterea în agregate alungite sub formă de șuvițe.

Imunitatea antiinfecțioasă este condiționată genetic, existînd persoane sau populații cu o rezistență crescută sau scăzută față de tuberculoză. Ea depinde apoi de starea fiziologică a organismului, ca și de boli care scad rezistența generală sau locală; astfel, în copilărie, rezistența la îmbolnăvire este mai mare între 3—12 ani. Malnutriția, stress-ul, administrarea de corticosteroizi sau alte imunodepresoare, boli ca diabetul, silicoza scad rezistența antiinfecțioasă.

Dintre factorii rezistenței naturale principalul rol îl joacă *macrofagele*. Macrofagul normal poate îngloba și, eventual, distruge un număr mic de bacterii. Un număr mare de bacili, mai ales cu virulență crescută, depășesc capacitatea bactericidă a fagocitului. Macrofagul devine eficient în urma activării prin limfokinele secretate de limfocitele T sensibilizate la contactul acestora în principal, cu antigenele proteice ale bacilului tuberculozei.

Scanned with OKEN Scanner

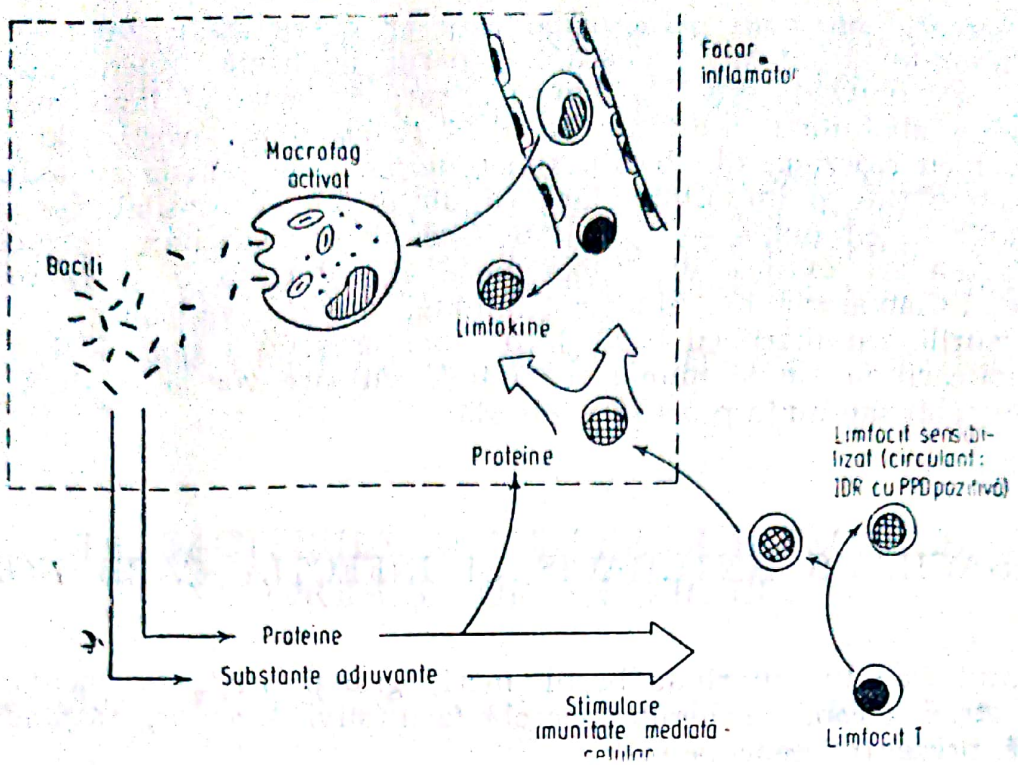


Fig. 3.4. Schema răspunsului imun în infecția tuberculoasă.

Aceasta subliniază rolul *imunității celulare* — limfocit T sensibilizat, macrofag. Remarcăm însă că dacă limfocitele T circulante sînt răspîndite în tot organismul, putînd fi evidențiate prin intradermoreacția cu PPD sau teste *in vitro* de imunitate celulară (inhibiția migrării macrofagelor). activarea macrofagelor se face în focarul inflamator, la locul multiplicării bacilului (fig. 3.4). Un număr mare de bacili cu virulență crescută declanșează o reacție inflamatorie puternică, cu distrugeri tisulare extinse, în care capacitatea bactericidă a fagocitelor este scăzută — infecția evoluează spre boală. Un număr mic de bacili cu virulență scăzută provoacă o inflamație care evoluează spre vindecare, cu persistența, de regulă, a bacililor în organism, sursă posibilă de reinfecție.

Echilibrul dintre proprietățile bacilului și imunitatea celulară explică astfel atît patogenia infecției cît și imunitatea antituberculoasă. Este de remarcat că o situație asemănătoare se întîlnește în celelalte infecții produse de mycobacterii și în primul rînd, în lepră.

Consecința practică profilactică a acestor noțiuni o constituie vaccinarea antituberculoasă cu BCG. BCG-ul este un bacil nevirulent obținut în laborator prin pasaj pe cartof cu bilă (peste 13 ani) a unei tulpini de *M. bovis*. Vaccinul conține bacterii vii. Introdus intradermic în primele zile după naștere stimulează apariția limfocitelor T sensibilizate și o inflamație productivă locală. Bacilul nu se răspîndește în organism, dar conferă o rezistență crescută față de infecția cu *M. tuberculosis*. Deși BCG-ul dispare din cicatricea postvaccinală după 2—3 ani, rolul lui de stimulare a imunității celulare este preluat de bacilii pătrunși, ca urmare, a infecției naturale. Dacă aceasta nu se produce, organismul își pierde hipersensibilitatea — reacția la PPD devine negativă. În consecință persoanele cu intradermoreacție negativă vor fi revaccinate. Astfel, rolul BCG este acela de a iniția starea de premuniție printr-un bacil lipsit de virulență.

Scanned with OKEN Scanner

O situație oarecum paradoxală, care ar putea așeza într-o lumină nouă imunitatea antituberculoasă, a apărut în urma experiențelor pe șoareci, efectuate de soții Youmans, care au reușit să imunizeze animalele de laborator față de infecția cu *M. tuberculosis,* folosind un vaccin preparat cu ribozomi din bacilii tuberculozei. Experiențele au arătat că se poate obține o imunitate, fără ca limfocitele T sensibilizate să fie decelabile în circulație — imunitate fără hipersensibilitate. Întrucît leziunile tisulare extinse din tuberculoză se datorează în mare măsură reacției inflamatorii de hipersensibilitate, această vaccinare ar evita neajunsurile vaccinării cu BCG. Experimentarea nu a ajuns însă în stadiul aplicării la om și numai rezultatele viitoare vor arăta dacă BCG va fi înlocuit sau nu în practica medicală.

3.3. BACILLUS ANTHRACIS ȘI INFECȚIA CĂRBUNOASĂ

Genul *Bacillus* cuprinde bacili mari, grampozitivi, producători de spori, strict aerobi sau aerob-anaerobi facultativi. Sînt larg răspîndiți în natură, prezenți deseori pe sol.

Singurul cu semnificație patogenă bine stabilită este *Bacillus anthracis,* agentul etiologic al antraxului (cărbune). Alți reprezentanți ai genului cum este *B. cereus,* intervin în toxiinfecțiile alimentare datorită capacității de a elabora o enterotoxină similară celei produse de tulpinile enterotoxigene de B. coli; unii sînt folosiți cu scop industrial pentru biosinteza antibioticelor *(B. polymyxa, B. licheniformis).*

La bacilul cărbunos s-au evidențiat și caracterizat parțial trei antigene importante: polipeptidul capsular (acid D-glutamic), antigenul somatic polizaharidic și o toxină proteică cu trei componente: antigenul protector, factorul letal și factorul de edem.

Antraxul este o antropozoonoză ce evoluează la animale erbivore, ca urmare a pătrunderii sporilor prezenți pe sol. De la acestea se poate transmite accidental omului, deseori ca boală profesională.

Manifestarea clinică umană este condiționată în primul rînd de calea prin care bacteriile pătrund în organism (tabelul 3.6).

Prezența capsulei permite inițierea infecției și difuzarea agentului patogen (capsula protejează bacteria de fagocitoză). Semnele clinice se datoresc toxinei, care se acumulează treptat în organismul infectat, atin-

Tabel 3.6.

Principalele manifestări clinice ale infecției cărbunoase

Calea de pătrundere	Forma clinică	Gravitate	Frecvență
— cutanată (leziuni)	pustula malignă	redusă	mare
— pulmonară (inhalare)	antrax pulmonar (pneumonie)	mare	redusă
— digestivă (alimente)	antrax intestinal (enterită)	mare	redusă

Scanned with OKEN Scanner

gînd nivelul maxim în momentul decesului. Pentru realizarea unei toxicităţi maxime, sînt necesare toate cele trei componente ale toxinei. Aşa de pildă, existenţa numai a factorului de edem sau a celui letal nu duc la nici o activitate biologică.

Profilaxia specifică, adresată animalelor cu deosebită eficienţă, a fost introdusă de către P a s t e u r, prin inocularea unor tulpini bacteriene atenuate prin căldură (42—43°C); ulterior au fost preparate şi alte vaccinuri. Pentru persoanele expuse profesional infecţiei, s-au utilizat, cu rezultate bune, vaccinuri conţinînd toxoizi.

Toate formele clinice pot fi însoţite de septicemie, care agravează evoluţia bolii.

3.4. BACTERIILE ANAEROBE ŞI INFECŢIILE PRODUSE DE ANAEROBI

Bacteriile strict anaerobe nu pot utiliza oxigenul din atmosferă şi nici să se dezvolte în prezenţa acestuia. Obţin energia exclusiv prin procese de fermentaţie. Necesită condiţii speciale de cultivare.

Anaerobii, foarte răspîndiţi în natură, au un spectru de acţiune deosebit de variat. În afara nenumăratelor specii saprofite, cu rol mai mult sau mai puţin precizat în natură, sînt de menţionat bacteriile care intervin în patologia umană, încadrate în două mari grupe:

A — *anaerobii exogeni,* telurici, sporogeni; pătrund în organism prin leziuni sau ingerare. Sînt toxigeni, acţionînd prin mecanisme în general specifice (genul *Clostridium*);

B — *anaerobii endogeni,* nesporulaţi, comensali ai cavităţilor naturale. Îşi manifestă patogenitatea la organisme cu rezistenţa slăbită şi prin asociaţii cu alte bacterii. Sînt reprezentanţi ai mai multor genuri.

3.4.1. GENUL CLOSTRIDIUM

Genul *Clostridium* cuprinde peste 90 specii de bacili lungi, grampozitivi, sporulaţi, dintre care numai unele au dovedit o patogenitate bine definită pentru om. Sînt prezenţi în tractul intestinal al animalelor şi uneori al omului, de unde ajung pe sol, rezistînd sub formă sporulată mulţi ani. Producerea bolii este condiţionată, după pătrunderea sporilor, de realizarea condiţiilor de anaerobioză (plăgi profunde cu ţesuturi necrozate, alimente conservate). Ca urmare, sporii germinează elaborînd toxinele specifice. La multe Clostridii în toxinogeneză, a fost semnalat fenomenul de conversie lizogenă.

Cei mai importanţi reprezentanţi, ca şi unele proprietăţi, sînt redate în tabelul 3.7.

1. *Cl. tetani* este agentul etiologic al tetanosului. Au fost descrise 10 tipuri antigenice bacteriene, cu o toxină unică. Exotoxina constituie principalul factor de patogenitate.

Dacă într-o plagă în care au pătruns sporii tetanici se creează condiţii de anaerobioză, sporii germinează, iar bacilii ce rămîn localizaţi,

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.7

Principalele proprietăţi ale unor Clostridii patogene

Specia	Sporul	Capsula	Hidrolizează		Fermentează		Exotoxina
			Gelatina	Cazeina	Glucoza	Lactoza	
Cl. tetani	sferic terminal	–	+	–	–	–	puternică
Cl. perfringens	oval, subterminal	+	+	–	+	+	moderată
Cl. septicum	,,	–	+	–	+	+	moderată
Cl. novyi	,,	–	+	–	+	–	puternică
Cl. histolyticum	,,	–	+	+	–	–	slabă
Cl. sporogenes	,,	–	+	+	+	–	–
Cl. botulinum	,,	–	+	+	+	–	puternică

elaborează exotoxina. Aceasta difuzează în organism, şi prin acţiunea specifică produce sindromul tetanic. Primele semne clinice apar după 3—10 zile, reprezentate mai ales prin contractura maseterilor (trismus); apar apoi contracturi tonico-clonice dureroase şi caracteristice ale întregii musculaturi, declanşate de stimuli externi (zgomot, lumină). În cazul neaplicării tratamentului, moartea se instalează, în majoritatea cazurilor, prin spasm laringian (asfixie). Aplicarea pe scară largă a toxoidului antitetanic sub forma tri- şi bivaccinului (Di-TePer, DiTe) a dus la scăderea masivă a morbidităţii. La aceasta se adaugă profilaxia cu regularitate a plăgilor, realizată prin vaccinare, asociată, cînd este necesar, cu administrarea serului specific (imunizare activă şi pasivă).

2. *Cl. botulinum* este agentul etiologic al botulismului, una dintre cele mai grave toxiinfecţii alimentare, datorită puternicei exotoxine, principal factor de patogenitate. S-au descris 8 tipuri serologice distincte, cu semnificaţie epidemiologică. Omul este sensibil faţă de tipurile A, B, E şi F; păsările, mai ales, la A şi B; rumegătoarele faţă de C şi D.

Exotoxina acţionează asupra sistemului nervos periferic la nivelul plăcilor neuromusculare, inhibînd sinteza acetil-colinei.

Botulismul se produce în urma ingerării de produse conservate (animale sau vegetale) contaminate, în care s-a dezvoltat exotoxina. După o incubaţie de 12—36 ore, boala debutează cu semne digestive nesemnificative (vărsături, constipaţie), urmate de manifestări paralitice, mai ales oculare, apoi paralizii ale muşchilor bucofaringieni (disfagie, paralizii de deglutiţie). Nu se înregistrează febră. În lipsa tratamentului, decesul survine după 36—48 ore, prin paralizii ale centrilor vitali.

În ultimii ani s-a descris botulismul infantil, ce evoluează la copii de 1—8 luni, datorat probabil ingerării de spori în primele săptămîni de viaţă. În intestin, *C. botulinum* se multiplică elaborînd exotoxina. Copilul prezintă constipaţie, este adinamic, uneori apar semnele caracteristice de paralizie ale nervilor cranieni sau a centrilor respiratori. S-au semnalat forme grave, cu deces subit.

3. *Clostridiile gangrenei gazoase* produc, datorită unei asocieri microbiene, leziuni histotoxice grave ale ţesuturilor moi. *Cl. perfringens* (Welchii) reprezintă principalul agent etiologic. Este prezent în microbiocenoza umană. S-au descris 5 tipuri antigenice (A—E), care se deosebesc prin diferitele combinaţii de toxine pe care le produc (12 toxine).

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.8

Bacterii izolate freevent din infecţii anaerobe

Infecţii produse	Bacterii izolate	
	Anaerobe	Aerob-anaerob facultative
Abcese	Bacteroides, Fusobacterium, Clostridium, Peptococcus, Peptostreptococcus	Aerob-anaerob facultative E. coli, Klebsiella, Proteus, Enterobacter, Pseudomonas, Streptococcus, Staphylococcus aureus
Intraabdominale	Bacteroides, Clostridium, Peptococcus, Peptostreptococcus	F. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Streptococcus
Materno-infantile	Bacteroides, Fusobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus	E. coli, Proteus, Streptococcus, Staphylococcus, Lactobacillus, Difteromorfi
Pleuro-pulmonare	Fusobacterium, Bacteroides, Peptostreptococcus, Peptococcus	Staphylococcus, Streptococcus, Enterobacteriaceae
Aparatul respirator superior	Bacteroides, Fusobacterium, Peptostreptococcus, Peptococcus, Propionibacterium, Actinomyces	Streptococcus, Staphylococcus
Septicemii	Bacteroides, Fusobacterium, Peptostreptococcus, Peptococcus, Clostridium	

Scanned with OKEN Scanner

Cea mai importantă este α-toxina, elaborată de toate bacteriile, dar mai ales de tipul A. α-toxina este o fosfolipază (lecitinaza C), cu acțiune specifică. Celelalte toxine sînt necrotice, hemolitice sau cu proprietăți enzimatice (colagenaze, proteinaze, hialuronidaze etc.).

Leziunea țesuturilor, pătrunderea sporilor și producerea condițiilor de anaerobioză sînt esențiale pentru realizarea bolii. După aceea are loc invadarea rapidă a țesuturilor și alterările histotoxice provocate de variatele toxine.

Cl. novyi (oedematiens), *Cl.histolyticum, Cl. septicum, Cl. sporogenes* contribuie la asocierea de bacterii anaerobe cauzatoare de gangrene gazoase. Deși s-au preparat vaccinuri (toxoizi) din clostridiile gangrenei gazoase, acestea nu au intrat în uzul curent.

În afara acestei manifestări clinice principale, *Cl. perfringens* poate provoca *viscerite* grave, cu variate puncte de plecare (tractul intestinal, genito-urinar etc.). Septicemiile, mai ales de origine puerperală, pun deseori în pericol viața bolnavului.

In sfîrșit, trebuie semnalate toxiinfecțiile alimentare, cauzate mai ales de tulpini de tipul A, producătoare de enterotoxină, factor de patogenitate imunologic distinct de celelalte toxine amintite mai înainte.

4. *Cl. difficile* este agentul etiologic al unei enterocolite pseudomembranoase, care poate fi letală. Aceste bacterii sînt prezente în microbiocenoza intestinală, fiind rezistente la unele chimioterapice ca ampicilina și clindamicina. Prin administrarea medicamentelor respective sau a altora cu spectru larg, sînt selectate tulpinile de *Cl. difficile* rezistente; acestea se multiplică și elaborează o toxină, responsabilă de simptomatologia clinică. Acțiunea specifică a toxinei nu a fost încă elucidată.

3.4.2. ANAEROBII NESPORULATI

Sînt bacterii prezente în cavitățile naturale ale organismului, ca reprezentanți ai microbiocenozelor. În cazul unor condiții locale sau generale favorizante, legate de scăderea potențialului de oxidoreducere în țesuturile ce sînt, de obicei, bine oxigenate, slăbirea rezistenței naturale a organismului (tumori, diabet, intervenții chirurgicale, tratamente cu imunosupresoare etc.), bacteriile endogene devin agenți patogeni ai unor variate boli infecțioase. Este de semnalat frecvența asociației microbiene, la care participă, pe lîngă anaerobii nesporulați, bacterii aerob-anaerob facultative.

Principalele bacterii anaerobe nesporulate, de interes medical, sînt prezentate în tabelele 3.8 și 3.9.

Îmbolnăvirile produse de aceste microorganisme sînt corelate, de obicei, cu localizarea normală endogenă, pe tegumente sau în cavități naturale. Majoritatea infecțiilor anaerobe sînt produse de bacteriile provenind din microbiocenozele cavității bucale, nazo-faringiene, intestin, tractul genito-urinar, tegumente. Prin invadarea țesuturilor învecinate sau diseminarea hematogenă, se înregistrează destul de frecvent localizări variate, în care sînt prezente asociații de bacterii anaerobe și specii aerob-anaerob-facultative.

Din multitudinea de manifestări clinice care au fost semnalate în ultimul timp, trebuie subliniate în mod deosebit abcesele ce apar în diferite organe (creier, ficat, plămîni etc.), peritonitele și alte localizări

Scanned with OKEN Scanner

abdominale în urma unor intervenţii chirurgicale, mai ales, pe intestin, infecţii consecutive unor manopere abortive şi desigur septicemiile. Tabelul 3.8 cuprinde asocierile microbiene izolate din principalele îmbolnăviri anaerobe.

Tabel 3.8

Principalele bacterii anaerobe nesporulate de interes clinic

	Genul	Specia
1. Bacili gramnegativi	a. Bacteroides	B. fragilis, B. melaninogenicus, B. corrodens
	b. Fusobacterium	F. nucleatum, F. necrophorum
2. Bacili grampozitivi	a. Eubacterium	E. lentum
	b. Propronibacterium	P. acnes, P. granulosum
	c. Lactobacillus	L. catenaforme
	d. Actinomyces	A. israelli, A. naeslundii
	e. Arachnia	A. propionica
	f. Bifidobacterium	B. eriksonii
3. Coci grampozitivi	a. Peptococcus	P. magnus, P. prevotti
	b. Peptostreptococcus	P. anaerobius
	c. Streptococcus	S. intermedius
4. Coci gramnegativi	a. Veillonella	V. parvula
	b. Acidaminococcus	A. fermentans

3.5. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE ŞI INFECŢIILE PRODUSE DE ACESTE BACTERII

3.5.1. GENERALITĂŢI

Enterobacteriile formează o familie mare de bacterii, cu sediul principal în intestinul omului şi animalelor, multe din ele contaminînd frecvent diferite elemente de mediu. Sînt bacili gramnegativi mobili (cili peritrichi) sau imobili, care cultivă pe mediile uzuale de cultură, inclusiv pe medii sintetice şi au un metabolism foarte activ. Pe medii se dezvoltă în colonii S (smooth) tipice, cu posibilitatea ca prin subculturi să se obţină culturi R (rough). Pe mediile lichide se dezvoltă caracteristic, tulburînd uniform mediul, cu aspect de văluri mătăsoase.

Multă vreme atenţia a fost concentrată asupra genurilor cu patogenitate certă — *Shigella* şi *Salmonella*, în consecinţă spre posibilităţile de diferenţiere a acestora de bacteriile comensale şi, în primul rînd, de *E. coli* prin degradarea lactozei, proprietate care stă la baza compoziţiei mediilor de cultură pentru bacteriile intestinale.

Complexitatea proceselor patologice determinate de enterobacterii, cunoaşterea aprofundată a biologiei acestora, necesitatea de a le diferenţia de alţi bacili gramnegativi, au dus la găsirea unor criterii mai precise, care stau la baza clasificării şi deci a identificării reprezentanţilor din familia *Enterobacteriaceae*. În selecţionarea proprietăţilor care au permis o clasificare ştiinţifică şi-au adus o contribuţie esenţială P. R. Edwards, W. H. Ewing (teste biochimice) şi F. Kauffmann (structură antigenică).

Tabel 3.10

Diferențierea triburilor de Enterobacteriaceae prin teste biochimice

Teste biochimice	Triburi				
	Escherichieae	Salmonelleae	Klebsielleae	Proteae	Yersinieae
H_2S	−	+	−	+ sau −	−
Indol	+ sau −	−	−	+ sau −	− sau +
Roșu metil	+	+	−	+	+
Voges Proskauer	−	−	+	−	−
Citra (Simmons)	−	+	+	+ sau −	−
Urează	−	−	− sau +	+ sau −	+ sau −
Fenilalaninadezaminază	−	−	−	+	−

Un set de teste biochimice face posibilă încadrarea unei tulpini în familie, trib și gen. Enterobacteriile sînt diferențiate de alți bacili gram-negativi prin degradarea oxidativă și fermentativă a glucozei, reducerea nitraților la nitriți și citocromoxidaza negativă. Alte teste, așa cum se vede în tabelul 3.10 caracterizează triburile și genurile. Ca și la alte bacterii, specia este dificil de definit. De aceea se iau în considerare atît proprietăți biochimice, cît și de structură antigenică. Pe aceste baze s-au propus mai multe clasificări, dintre care, cea întocmită de Edwards și Ewing (tabelul 3.11) prezintă avantaje prețioase, lucrative, în scop

Tabel 3.11

Familia Enterobacteriaceae

Tribul	Genuri	Specii
I. Escherichieae	Escherichia	Escherichia coli
	Shigella	Shigella dysenteriae
		Shigella flexneri
		Shigella boydi
		Shigella sonnei
II. Edwardsielleae	Edwardsiella	Edwardsiella tarda
III. Salmonelleae	Salmonella	Salmonella cholerae suis
		Salmonella typhi
		Salmonella enteritidis
	Arizona	Arizona hinshawii
	Citrobacter	Citrobacter freundi
		Citrobacter diversus
IV. Klebsielleae	Klebsiella	Klebsiella pneumoniae
	Enterobacter	Enterobacter aerogenes
		Enterobacter cloacae
		Enterobacter hafniae
	Serratia	Serratia marcescens
V. Proteae	Proteus	Proteus mirabilis
		Proteus vulgaris
		Proteus rettgeri
		Proteus morganii
	Providencia	Providencia stuartii
VI. Yersinieae	Yersinia	Yersinia pestis
		Yersinia pseudotuberculosis
		Yersinia enterocolitica
VII. Erwinieae	Erwinia	
	Pectobacterium	

Scanned with OKEN Scanner

de diagnostic, cu toate că este certă o restructurare în viitor a familiei, mai ales pe criterii genetice. Se remarcă includerea în familie a genului *Yersinia*, inclusiv a speciei *Y. pestis*.

În aceleași scopuri practice de identificare bacteriană, caracterizarea antigenică ocupă o poziție importantă. Sînt bine cunoscute imunologic cele trei tipuri principale de antigene:

1. *antigenul O*, similar cu *endotoxina* și constituit dintr-un complex molecular în care componenta lipidică, în special lipidul A este principalul răspunzător al toxicității, cea proteică conferă imunogenicitatea, iar polizaharidul imprimă specificitatea antigenică. Acest antigen fixează în genurile sau speciile familiei, *grupuri antigenice;*

2. *antigenul H*, util în diferențierea unor tipuri antigenice, mai ales la *Salmonella;*

3. *antigenele de înveliș* (K), uneori situate în capsulă *(Klebsiella)*, alteori ca antigene de suprafață, cu participare în definirea tipurilor antigenice, mai ales la *Klebsiella, E. coli* și unele *Salmonelle*. Pentru scopuri epidemiologice s-a dovedit de mare importanță stabilirea în cadrul speciilor a lizotipurilor și tipurilor colicinogene, definite prin sensibilitatea la diferite preparate fagice sau colicine.

Importanța enterobacteriilor poate fi apreciată din mai multe puncte de vedere:

a. **pe plan biologic,** au adus informații prețioase privind metabolismul și genetica bacteriană, cu contribuții esențiale în conturarea biologiei moleculare. Au servit de asemenea la inițierea studiilor asupra microbiocenozelor;

b. **pe plan igienico-sanitar,** prezența enterobacteriilor și mai ales a *E. coli* în mediu reprezintă indicatori ai contaminării fecale. Este astfel foarte importantă determinarea prezenței și cantității (titrul) *E. coli*, pentru caracterizarea igienico-sanitară a apei potabile și a alimentelor;

c. **participare în patologia umană.** Enterobacteriile au un rol important în determinarea unei patologii complexe. Trebuie făcută o diferențiere între genurile cu patogenitate certă, *Shigella* și *Salmonella* și genurile în mod obișnuit comensale, dar care pot acționa ca patogeni oportuniști.

Este de remarcat faptul că deși prin localizare se consideră bacterii intestinale, enterobacteriile, mai ales, cele comensale, pe lîngă infecțiile intestinale caracteristice, pot să se localizeze și să determine infecții aproape în toate țesuturile organismului uman, producînd o gamă largă și diversă de infecții. De aceea, izolarea unei enterobacterii dintr-un produs patologic cu proveniență extraintestinală capătă o semnificație etiologică. Pentru toate enterobacteriile, un mare risc îl constituie însoțirea infecției de bacteriemie și, în consecință, pericolul instalării șocului endotoxic și al coagulării intravasculare cu mortalitate ridicată. Toate enterobacteriile au o contribuție majoră în etiologia bolilor însoțite de sindrom diareic: toxiinfecții alimentare și enterite. Acestea, în special, la copil, sînt cauze principale de morbiditate, dar prin declanșarea dezechilibrului hidromineral pot să aibă o contribuție în mortalitate.

Enterobacteriile, mai ales cele comensale, sînt în prezent agenți etiologici, poate cei mai frecvenți, ai infecțiilor intraspitalicești.

Scanned with OKEN Scanner

3.5.2. GENURI CU PATOGENITATE CERTĂ: SHIGELLA ŞI SALMONELLA

Dizenteria bacilară este infecţia produsă de speciile genului *Shigella* (tabelul 3.12). Se manifestă prin febră moderată, vărsături, tenesme şi scaune caracteristice muco-sanguinolente. În manifestările clinico-epidemiologice ale dizenteriei au apărut în ultimele patru decenii modificări esenţiale. Aceasta s-a datorat dispariţiei din cele mai multe ţări a dizenteriei cu *Sh. disenteriae shigae,* care a determinat un tablou clinic

Tabel 3.12

Speciile şi tipurile genului Shigella

Specia	Tipul
Shigella dysenteriae	1 Sh. dysenteriae shigae 2 Sh. dysenteriae schmitzi 3—10 tipurile Large-Sachs
Shigella flexeneri	1—6; variantele x şi y
Shigella boydi	1—15
Shigella sonnei	S şi R

de mare gravitate prin toxina sa şi apariţia îmbolnăvirilor mai ales sub formă de epidemii. În 1950, la noi în ţară, s-au descris ultimele cazuri de îmbolnăviri cu b. dizenteric Shiga. În prezent dizenteria este produsă în primul rînd de *Sh. flexneri,* urmat îndeaproape de *Sh. sonnei,* mai rar întîlnindu-se celelalte specii şi tipuri de *Shigella.* Ca o consecinţă, manifestările clinice au îmbrăcat forme mai uşoare, de multe ori etichetate ca enterită. Epidemiologic, dizenteria a căpătat caracterul unei infecţii cu apariţie sporadică, instalîndu-se în felul acesta o endemie, cu prezenţă de numeroşi purtători. Pe acest fond, în colectivităţi cu condiţii igienico-sanitare deficitare, pot să apară epidemii de dizenterie, unele din acestea cu transmitere hidrică. Apreciind că 10—15% din toate cazurile de enterită (boală diareică) au etiologie dizenterică, se poate ajunge la concluzia că dizenteria, prin morbiditatea cu care se înregistrează, este o problemă prioritară.

Ca şi în alte infecţii intestinale, transmiterea este fecal-orală. Bacteriile străbat tractusul intestinal şi se localizează pe mucoasa intestinului gros. Datorită a două antigene de suprafaţă pătrund şi se multiplică în epiteliul intestinului gros. Din celula epitelială ajung în lamina propria, sînt fagocitate şi consecutiv se eliberează endotoxina. Aceasta produce microfocare de necroză epitelială, ceea ce duce la apariţia sîngelui, mucusului şi leucocitelor în scaunele diareice. Este încă insuficient precizat rolul enterotoxinei evidenţiată la unele tulpini de *Sh. flexneri.* Unele tipuri de *E. coli* produc printr-un mecanism similar o infecţie asemănătoare cu dizenteria. Capacitatea *Shigellelor* şi a tulpinilor de *E. coli* invadante de a penetra şi a se multiplica în celula epitelială este evidenţiată prin testul kerato-conjunctivitei (Serény).

Salmonella. Din cele peste 1500 de specii care parazitează animalele şi omul, peste 100 se întîlnesc la noi în ţară, putînd produce îmbolnăviri cuprinse în termenul general de **salmoneloze.** Marea majoritate a *Salmo-*

Scanned with OKEN Scanner

nellelor întîlnite în patologia umană fac parte din primele 5 grupe ale schemei Kauffmann-White. Speciile adaptate strict la om sînt *S. typhi* şi *S. paratyphi* A; unele *Salmonelle* se întîlnesc la o singură specie animală; altele la mai multe specii, de la moluşte pînă la om. Multe din *Salmonellele* care parazitează animalele pot produce infecţii la om. Acestea pot fi grupate în salmoneloze majore şi minore (tabel 3.13).

Tabel 3.13

Infecţii produse de Salmonella

Îmbolnăvire	Etiologie
I. *Salmoneloze majore :*	
Febra tifoidă	S. typhi
Febrele paratifoide	S. paratyphi A, S. paratyphi B
II. *Salmoneloze minore :*	
Toxiinfecţii alimentare	S. typhimurium, S. enteritidis, S. paratyphi B, S. panama
Enterite	Aceleaşi specii
Stări septicopiemice	S. choleraesuis şi alte specii din grupul C

În ultima vreme s-a constatat în majoritatea ţărilor o reducere a cazurilor de febre tifoparatifoide şi menţinerea sau creşterea incidenţei celorlalte îmbolnăviri şi mai ales prin toxiinfecţii alimentare. Acest fenomen a fost însoţit de pătrunderea în circulaţie la animale şi om a unui număr crescut de tipuri de Salmonelle.

Febrele tifoparatifoide se manifestă prin febră, debut insidios, semne de intoxicaţie a S.N.C. (stare tifică), bradicardie, leucopenie şi eventual erupţie discretă (rozeole tifice). După infecţie, 3—5% din bolnavi rămîn purtători cronici.

Mecanismele prin care se produc infecţia ţin de capacitatea invazivă a *Salmonellei,* datorită protecţiei faţă de forţele de apărare a gazdei prin antigenul O, iar la b. tific şi prin funcţia antifagocitară a antigenului Vi. Este foarte probabilă intervenţia altor antigene de suprafaţă. Astfel se explică penetrarea bacteriilor prin celulele epiteliale ale intestinului subţire în sistemul limfatic şi mai ales, în ganglionii mezenterici, fagocitarea şi multiplicarea lor în macrofag. După înmulţirea în sistemul limfatic, are loc bacteriemia, invadarea S.R.E. şi eliminarea în intestin prin bilă. Multe din semnele clinice sînt rezultatul endotoxinei şi a reacţiei de imunitate, mai ales a celei mediate celular, cu intervenţia inclusiv a macrofagului activat. O proporţie de 3—5% din bolnavi rămîn purtători cronici. Datorită ridicării standardului de viaţă, depistării şi măsurilor igienico-sanitare luate faţă de purtători, precum şi profilaxiei specifice prin vaccin antitific, la noi în ţară a avut loc o scădere continuă a incidenţei febrei tifoide (fig. 3.5). Se remarcă apariţia de tulpini de *S. typhi* rezistente plasmidic la cloramfenicol şi ampicilină.

Toxinfecţiile alimentare (TA) sînt îmbolnăviri caracterizate prin apariţia de vărsături şi diaree, în urma consumului unui aliment, în care bacteriile s-au înmulţit şi au eliberat produşi toxici. Ca etiologie, pe primul loc se situează speciile de *Salmonelle* (tabelul 3.13), secondate ca frecvenţă de *Staphylococcus aureus.* În afară de acestea mai pot pro-

Scanned with OKEN Scanner

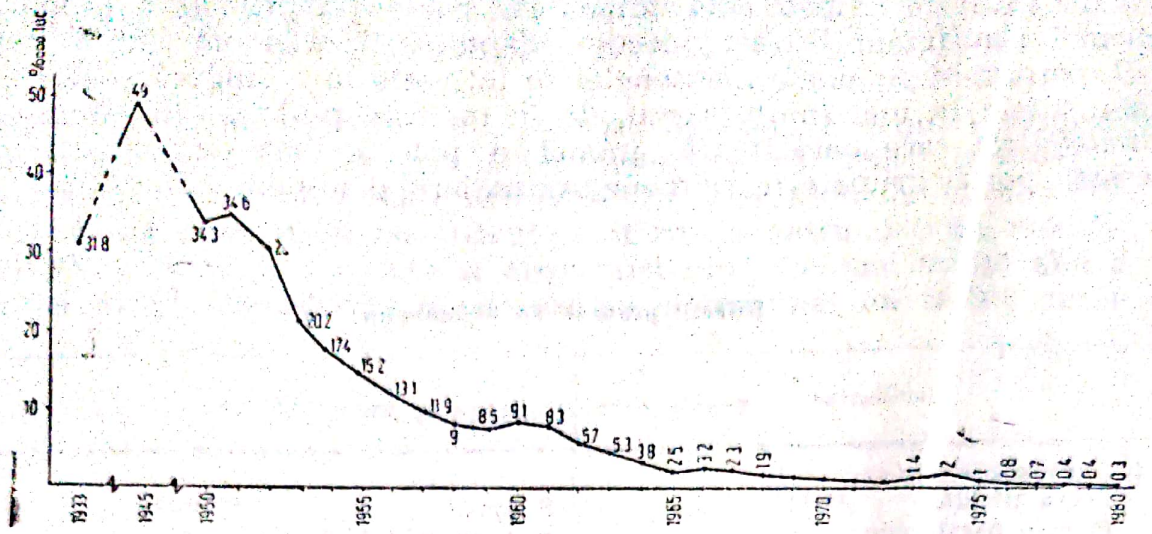


Fig. 3.5. Morbiditatea prin febra tifoidă în România între 1933—1980.

duce T.A. unele enterobacterii, *Bacillus cereus* și *Clostridium perfringens* tip A, în toate aceste cazuri fiind vorba de tulpini enterotoxigene. T.A. produse de Salmonella au o incubație mai lungă (12—48 h), evoluează cu febră și predomină sindromul diareic. În cazuri foarte rare se pot produce septicemii. În T.A. stafilococice incubația este scurtă (2—8 ore), cu afebrilitate și predomină vărsăturile, vindecarea producîndu-se rapid în 12—24 ore. Rezultă că primele au un caracter mai pronunțat infecțios, celelalte fiind mai mult intoxicații. În T.A. cu *Salmonella* intervin endotoxina și o enterotoxină cu proprietăți și mecanism distincte de cele ale enterotoxinei holerice. Pentru T.A. stafilococice, alături de enterotoxina care declanșează prin acțiune asupra centrilor motilității intestinale vărsături, în producerea sindromului diareic intervine și δ-toxina. În T.A. cu celelalte specii bacteriene intervin enterotoxine, care dau rezultat pozitiv în testul ansei ligaturate (vezi cap. 7). Botulismul este o formă aparte de T.A.

Enterite. Speciile de *Salmonelle* care produc T.A., dacă pătrund în intestin pe cale fecal-orală, se multiplică și produc enterite, mai ales, la copil. Se caracterizează printr-o evoluție mai gravă, cu scaune mucoapoase, uneori chiar mucosanguinolente și cu deshidratare pronunțată. Pot să apară sub formă de epidemii în colectivități de copii și în spital.

Septicopiemii, produse în special de *Salmonelle* din grupul C, în primul rînd de *S. cholerae suis,* cu stări febrile prelungite, focarele piemice avînd localizări variate: osteomielită, abcese pulmonare, subcutanate, cerebrale, meningită etc.

3.5.3. ENTEROBACTERIILE ȘI ENTERITELE

În multe țări se consideră că cel puțin 50% din enterite au etiologie virală. Pentru condițiile existente la noi în țară, etiologia cu enterobacterii și, în general etiologia bacteriană, are o importanță majoră. Alături de cele două genuri cu patogenitate certă au intervenție etiologică și

alte enterobacterii, în primul rînd *E. coli*. Dependent de manifestările clinice, mai ales aspectul scaunelor şi mecanismele prin care se declanşează sindromul diareic, se pot defini două tipuri principale:

1. *Enterita de tip dizenteriform*, produsă de *Shigella* şi tipuri invadante de *E. coli*, cu scaune mucosanguinolente şi cu mecanism similar etiopatogenetic (v. *Shigella*). Proprietăţi invadante se întîlnesc, mai ales, la populaţii de *E. coli* din grupul antigenic O_{124}. Se poate aprecia că aproximativ 15% din cazurile de enterită au o astfel de etiologie, cu predominanţa la noi în ţară a Shigellelor.

2. *Enterită cu scaune muco-apoase* (de tip holeriform), produsă de populaţii de *E. coli* cu proprietatea de a produce enterotoxină. La acestea s-au găsit două tipuri de enterotoxină: L.T.-termolabilă şi S.T.-termostabilă, unele tulpini producînd ambele toxine, altele numai LT sau ST. Cel puţin pentru LT s-a stabilit că are o moleculă structurată asemănător şi cu un mecanism biochimic identic cu enterotoxina holerică. Se cunoaşte de asemenea, că la *E. coli* ambele tipuri de enterotoxină au determinism plasmidic. Deoarece celula ţintă a acţiunii enterotoxinei este reprezentată de enterocit, pentru ca o tulpină enterotoxigenă să declanşeze sindromul diareic, trebuie să populeze intestinul subţire. Pentru aceasta intervin pili speciali, caracterizaţi antigenic şi prin proprietăţile lor hemaglutinate numiţi factori comuni de ataşare (CFA), prin care favorizează aderarea de mucoasa intestinului subţire. Atît producerea de enterotoxină, cît şi pilii (CFA) sînt de determinism plasmidic, ceea ce înseamnă că aceste proprietăţi pot fi transferate oricărei populaţii de *E. coli*, sau chiar la alte enterobacterii. De aceea în aceste forme de îmbolnăvire se întîlnesc mai frecvent tulpini enterotoxigene de *E. coli*, precum şi din genurile *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Proteus* şi *Yersinia enterocolitica*. S-au semnalat asemenea tulpini şi din speciile *Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas hydrophila* şi *Cl. perfringens* tip A.

Tipuri antigenice de *E. coli* ($O_{111}B_4$, $O_{55}B_5$, $O_{26}B_7$, $O_{87}B_7$ etc.) s-au găsit în epidemii de boală diareică la sugari. În ultimii 10 ani, astfel de epidemii nu s-au mai întîlnit. În viitor rămîne de cunoscut care sînt (dacă există) mecanismele specifice prin care ele declanşează sindromul diareic. De subliniat că în ultimii ani şi la noi în ţară aceste tipuri antigenice au fost izolate mai frecvent la copiii sănătoşi decît la cei bolnavi.

Un alt tip de enterită îl constituie enterita cu *Yersinia pseudotuberculosis* şi *Y. pestis*, care interesează ganglionii mezenterici şi în care infecţia se poate generaliza.

În ultima vreme în mai multe ţări s-a semnalat intervenţia în enterită a speciei *Campylobacter fetus*.

3.5.4. PARTICIPAREA BACTERIILOR COMENSALE ŞI A ALTOR BACTERII GRAMNEGATIVE ÎN PATOLOGIA UMANĂ

O grupă mare de bacterii gramnegative, cu morfologie şi proprietăţi de cultură asemănătoare, constituită din enterobacterii comensale, b. gramnegativi fermentativi şi, mai ales, b. gramnegativi nefermentativi, ocupă azi, în patologia umană, o poziţie importantă, fiind o cauză principală de infecţii endogene şi intraspitaliceşti. În tabelul 3.14 sînt enumerate enterobacteriile comensale cu participare în patologia umană: genurile *Escherichia, Citrobacter, Arizona, Klebsiella, Enterobacter, Ser-*

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.14

Bacterii gramnegative comensale cu participare în patologie umană

	Genul şi specia
Bacterii fermentative din familia *Enterobacteriaceae*	*Escherichia coli* Citrobacter freundi Arizona hinshawii *Klebsiella pneumoniae* Enterobacter aerogenes Enterobacter cloacae Enterobacter hafniae Serratia marcescens *Proteus mirabilis* Proteus vulgaris Providencia stuartii Providencia alcalifaciens Yersinia enterocolitica
Alte bacterii fermentative	Aeromonas hydrophila Plesiomonas shigelloides Campilobacter fetus Pasteurella ureae
Bacterii gramnegative nefermentative	Eikenella corrodens Acinetobacter calcoaceticus Alcaligenes faecalis Moraxella lacunata Moraxella lwoffii Moraxella urethralis Flavobacterium meningosepticum Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas fluorescens Pseudomonas putida Pseudomonas cepacia

ratia, Proteus şi *Providencia;* în grupa altor bacili gramnegativi fermentativi se includ: *Plesiomonas, Aeromonas, Campilobacter, Actinobacillus, Chromobacterium* şi *Pasteurella;* bacilii gramnegativi nefermentativi, cuprind genurile *Pseudomonas, Moraxella, Alcaligenes, Acinetobacter, Achromobacter, Flavobacterium.* Condiţiile care determină creşterea participării lor în patologia umană ţin de unele particularităţi ale activităţii medicale actuale şi anume:

1. *proliferarea explorărilor medicale* prin puncţii, biopsii, sondaje etc., a terapiei cu imunosupresoare (hormoni, cortizon) şi a utilizării chimioterapicelor cu spectru larg;

2. *dezvoltarea secţiilor de reanimare şi terapie intensivă,* cu utilizarea unor procedee specifice, cum sînt respiraţia cu intubare, administrare de substanţe în perfuzie continuă (sindromul de cateter), creşterea proporţiei între subiecţii internaţi a celor cu rezistenţă antiinfecţioasă scăzută: tumori, diabet, operaţii mari chirurgicale (abdominale, cardiace, S.N.C.); acordarea unei atenţii scăzute măsurilor de asepsie ca o consecinţă a utilizării antibioticelor etc.

Adăugînd la acestea rezistenţa crescută la antibiotice a multora din bacteriile amintite, a devenit posibil ca ele să ocupe primul loc în apariţia infecţiilor intraspitaliceşti şi a celor endogene (infecţii cu microorganisme care fac parte din microbiocenozele proprii). Probleme importante de asistenţă medicală, atît prin incidenţa cu care se izolează

Scanned with OKEN Scanner

dintr-o diversitate de infecții, cît și prin greutățile de terapie, pun bacteriile din genurile *Escherichia, Klebsiella* și *Pseudomonas*. Acesta din urmă, privit multă vreme ca o bacterie la limita de trecere dintre saprofit și parazit, s-a văzut că produce o mare varietate de infecții grave, de multe ori sub formă de epidemii intraspitalicești, devenind unul dintre constituienții principali din etiologia acestui tip de infecții. De altfel, s-a constatat că bacteriile din genul *Pseudomonas*, cu specia principală *P. aeruginosa*, pot produce multe enzime și toxine, cu rol în conferirea patogenității: mucus extracelular (glicocalix), hemolizine, lipaze, exotoxină și enterotoxină.

Infecțiile principale și genurile sau speciile frecvent întîlnite în etiologia lor sînt prezentate în tabelul 3.15.

Tabel 3.15

Bacterii gramnegative întîlnite în diferite tipuri de infecție

Infecția	Specii izolate frecvent	Specii izolate rar
Septicemii	Escherichia coli	Serratia marcescens
	Klebsiella pneumoniae	Proteus
	Pseudomonas aeruginosa	Pseudomonas
Meningite	E. coli (la sugar)	Campylobacter
	K. pneumoniae	Eikenella corrodens
	Moraxella	Achromobacter
	Flavobacterium (sugar imatur)	
	Pseudomonas	
Infecții urinare (cistite, pielite, pielonefrite)	E. coli	Aeromonas hydrophila
	Klebsiella	Campylobacter
	Alcaligenes	Plesiomonas
	Proteus mirabilis	Providencia
Infecții ale plăgilor	E. coli	Aeromonas hydrophila
	Proteus	Chromobacterium
	Serratia	Alcaligenes
	Pseudomonas	etc.
Arsuri infectate	Pseudomonas	Moraxella
	Klebsiella	
Abcese cu localizări variate	E. coli	Proteus
	Pseudomonas	Serratia
	Klebsiella	
Infecții piogene ale mucoaselor (rinosinuzite, otite etc.)	Klebsiella	Moraxella
	E. coli	Pasteurella ureae
	Pseudomonas	
Infecții pulmonare	Klebsiella	Acinetobacter
	Pseudomonas	Proteus
	E. coli	Moraxella

Klebsiella rhinoscleromatis și *K. ozenae* produc infecții cronice ale mucoaselor nazale

3.6. VIBRIO CHOLERAE ȘI HOLERA

Genul *Vibrio* este constituit din numeroase microorganisme cu patogenitate variabilă, clasificate în mai multe specii. Dintre reprezentanții speciei *V. cholerae*, trebuie amintiți în primul rînd agenții etiologici ai holerei (*V. cholerae* clasic și biotipul *El Tor*, care prin specificitatea

Scanned with OKEN Scanner

antigenului O (reacţii de aglutinare) au fost plasaţi în grupul O : 1. Celelalte tulpini ale speciei, care nu aglutinează cu serul test O : 1 (neaglutinabile — NAG), apreciate iniţial ca nepatogene, pot cauza boli diareice sporadice, cu evoluţie uşoară.

Vibrio parahaemolyticus şi alte specii halofile au fost izolate din sindroame diareice legate de consumul unor alimente de proveniență marină. În afara acestora, au fost descrise numeroase specii nepatogene, prezente, mai ales, în ape de suprafaţă (*V. Metchnikovii* şi alţi vibrioni de apă).

Morfologic, toţi reprezentanţii genului se prezintă ca şi bacili scurţi, gramnegativi, încurbaţi, foarte mobili, datorită unui cil polar. Cultivarea pe medii alcaline (*p*H. 9) permite selectarea faţă de alte bacterii intestinale. Utilizarea unor zaharuri a permis diferenţierea a şase tipuri de fermentare (schema Heiberg — tabelul 3.16). Tipul I cuprinde toţi vibrionii holerici. La aceste determinări se adaugă testele oxidazei, producerii de indol, hidrogenului sulfurat, reducerii nitraţilor la nitriţi, care contribuie la identificarea vibrionilor. Aceştia posedă un antigen flagelar (H) comun şi antigene somatice (O) specifice, pe baza cărora majoritatea tulpinilor au fost clasificate în şase grupe antigenice O. Grupul O : 1 conţine biotipurile *V. cholerae* şi *V. El Tor*. Cu ajutorul a trei factori antigenici O (A, B, C) acest grup a fost la rîndul său divizat în serotipurile Inaba, Ogawa şi Hikojima.

Tabel 3.16

Diferenţierea V. cholerae (după schema lui Heiberg)

Zaharuri	Tipul de fermentare					
	I	II	III	IV	V	VI
Zaharoză	+	+	+	+	−	−
Manoză	+	−	+	−	+	−
Arabinoză	−	−	+	+	−	−

Dat fiind că în ultima vreme locul vibrionului holeric clasic a fost ocupat de biotipul El Tor, a devenit necesară, mai ales din motive epidemiologice, diferenţierea celor două biotipuri cu ajutorul unor teste prezentate în tabelul 3.17.

Tabel 3.17

Diferenţierea biotipurilor V. cholerae şi El Tor

Testul	Biotipul	
	V. cholerae	V. El Tor
— Aglutinarea hematiilor de de găină	−	+
— Producerea de hemolizină solubilă	−	+
— Sensibilitatea la polimixina B	+	−
— Sensibilitatea la bacteriofagul grup IV	+	−

Scanned with OKEN Scanner

Principalii factori de patogenitate sînt factorul de colonizare şi enterotoxina. Infecţia se produce pe cale digestivă (apă, alimente). Datorită factorului de colonizare au loc o multiplicare intestinală masivă a vibrionilor şi ataşarea acestora de enterocit. Se eliberează enterotoxina, răspunzătoare pentru declanşarea sindromului diareic. În consecinţă apar multe scaune diareice muco-apoase, cu aspect de zeamă de orez (riziforme). Rezultă o pierdere masivă de apă (15—20 l/zi) şi un dezechilibru hidromineral, deosebit de periculoase pentru bolnav. Deshidratarea este accentuată de numeroasele vărsături. La semnele digestive, se adaugă crampe musculare, scăderea tensiunii arteriale, stare de torpoare şi moartea, în lipsa unei intervenţii rapide (în special, rehidratarea). Cu toate acestea, unele îmbolnăviri, produse mai ales de biotipul El Tor, pot evolua ca sindroame diareice mai uşoare, ce pot fi confundate cu cele determinate de alte bacterii enteropatogene.

Holera evoluează uneori epidemic şi chiar pandemic. Menţinerea holerei în stare endemică, ca şi evoluţia ei epidemică, sînt favorizate de unele particularităţi epidemiologice. În acest sens este de reţinut faptul că, pe lîngă apariţia cazurilor manifeste clinic, se înregistrează un număr semnificativ de purtători, mai ridicat în cazul epidemiilor cu biotipul El Tor, care constituie principala sursă de infecţie. La aceasta se adaugă persistenţa, uneori îndelungată, a vibrionului holeric în mediu extern, mai ales acvatic.

Profilaxia specifică se realizează cu vaccinuri conţinînd culturi bacteriene inactivate; eficienţa lor s-a dovedit limitată (30—50%). Sînt în stadiu experimental preparate obţinute din toxoidul enterotoxinei holerice.

3.7. GENUL HAEMOPHYLUS ŞI BORDETELLA

3.7.1. GENUL HAEMOPHYLUS

Genul *Haemophylus* cuprinde cocobacili gramnegativi, imobili, nesporulaţi, care se dezvoltă pe medii cu sînge sau derivate de sînge, bogate în factorii de creştere X (identic cu hemina) şi V (identic cu NAD şi NADP).

Clasificare: genul *Haemophylus* include specii patogene şi specii comensale, prezente îndeosebi în microbiocenoza rinofaringiană (tabel 3.18).

H. influenzae este principalul reprezentant al genului. Datorită frecvenţei cu care s-a izolat de la bolnavii de gripă, multă vreme a fost considerat agent etiologic al acestei boli. Astăzi se cunoaşte că poate cauza pneumonii secundare, care se suprapun peste infecţia virală gripală, agravîndu-i evoluţia.

Majoritatea hemofililor din tractul respirator sînt necapsulaţi, în timp ce tulpinile patogene au o capsulă polizaharidică. Antigenul polizaharidic capsular separă 6 tipuri antigenice, notate de la a la f, care pot fi identificate cu antiseruri monospecifice de tip prin reacţii de aglutinare, de umflare a capsulei sau de imunofluorescenţă. Capsula constituie un important factor de patogenitate, prin efectul antifagocitar. Infecţii cauzate: tulpinile capsulate de *H. influenzae,* îndeosebi tipul b, acţionează

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.18

Clasificarea genului Haemophylus

Reprezentanți	Necesități în factor X	Necesități în factor V	Hemoliză	Prezent în organism	Infecții cauzate
H. influenzae	+	+	–	rinofaringe	Infecții respiratorii superioare și inferioare, meningite
H. parainfluenzae	–	+	–	comensal în rinofaringe	rare endocardite
H. haemolyticus	+	+	+	comensal în rinofaringe	rinofaringite la copii
H. aphrophylus	+	–	–	comensal în rinofaringe	rar pneumonii, endocardite
H. aegyptius (bacil Koch–Weeks)	+	+	–	mucoasa conjunctivală	conjunctivită acută
H. ducreyi	+	–	+	mucoasa genitală	șancru moale

ca patogeni primari, cauzînd faringite, laringo-epiglotite (crup) la copiii mici, traheobronșite acute, pneumonii, otite medii, artrite septice, pericardite. La copiii mici pînă la 3—4 ani, se constată o incidență crescută a meningitelor cu tip b. După trecerea prin infecții apare o imunitate specifică de serotip. Hemofilii necapsulați sînt prezenți la sănătoși în microbiocenoza faringiană; uneori cauzează infecții respiratorii acute, secundare infecțiilor virale, sau participă în etiologia unor infecții respiratorii cronice. Hemofilii necapsulați au fost incriminați în exacerbările acute ale bronșitelor cronice.

H. ducreyi cauzează șancrul moale, boală cu transmisie sexuală. Leziunile ulcerative care apar pe organele genitale sînt însoțite de prinderea ganglionilor regionali, care devin mari și dureroși. În secreția purulentă se pot observa, la microscop, cocobacili gramnegativi, așezați în lanțuri. Pentru diagnostic se mai poate efectua o i.d.r., folsind ca antigen suspensii inactivate de *H. ducreyi* (reacția Ito-Reensterna). Reacția rămîne pozitivă mult timp după infecție.

Speciile comensale: *H. parainfluenzae, H. haemolyticus, H. aphrophylus* au fost uneori implicate în rinofaringite, pneumonii, endocardite sau în producerea plăcii dentare. *H. aegyptius* cauzează o conjunctivită acută cu mare contagiozitate.

3.7.2. GENUL BORDETELLA

Genul *Bordetella* include cocobacili gramnegativi, imobili, nesporulați, cu capsulă. Reprezentanții principali sînt *B. pertussis* și *B. parapertussis,* care cauzează tusea convulsivă. *B. bronhiseptica,* întîlnită de obicei la animale, poate determina la om forme atipice de tuse convulsivă.

Scanned with OKEN Scanner

Bordetellele se izolează pe medii bogate în sînge (mediul Bordet-Gengou), dînd colonii mici, netede, mucoide, ce cuprind germeni capsulați, reprezentînd faza I, virulentă. Prin subcultivări se ajunge la faza IV rugoasă, cu germeni necapsulați, trecînd prin fazele II și III intermediare.

B. pertussis are mai multe antigene: un aglutinogen și o hemaglutinină se află la suprafața celulei. Peretele celular conține endotoxina, antigenul protector (în cantități mari la bacterii de faza I) și un factor histaminosensibilizant. S-a mai evidențiat o toxină termolabilă și alte antigene.

Infecția interesează epiteliul traheal, bronșic și bronhiolar. Bordetella aderă și se multiplică la suprafața epiteliului ciliat, alterîndu-l. Toxina, eliberată din bacterii dezintegrate, promovează hipersecreția de mucus și apariția simptomelor catarale, stimulînd totodată tusea paroxistică și bronhospasmele. Se produc apoi necroze epiteliale, inflamație peribronhială cu infiltrația de PMN și pneumonie interstițială. Bronhiolele obstrucționale cu mucus determină oxigenare redusă a sîngelui, ceea ce favorizează apariția convulsiilor.

Infecția clinică: tusea convulsivă apare după o incubație de 1—2 săptămîni, debutînd cu fenomene catarale. În perioada de stare, tusea are un caracter exploziv, accesele de tuse terminîndu-se prin vomă, cianoză și convulsii.

În tabloul sanguin găsim leucocitoză (15.000—30.000/ml) cu limfocitoză.

Profilaxia se realizează cu vaccin antipertussis, obținut din *B. pertussis* faza I, celule omorîte prin căldură. De obicei se asociază cu anatoxinele difterică și tetanică în trivaccin, care se administrează obligatoriu la copii, în primul an de viață.

3.8. GENUL BRUCELLA ȘI BRUCELOZA

Genul *Brucella* este alcătuit din cocobacili sau bacili scurți, gramnegativi, patogeni pentru animale, de la care se pot transmite omului. Speciile întîlnite la om sînt *B. suis, B. abortus, B. melitensis* și *B. canis*. Celelalte, *B. neotomae* și *B. ovis* nu au fost încă dovedite a produce îmbolnăviri umane.

Cultivate pe medii speciale de cultură se dezvoltă colonii netede (S), cu excepția *B. canis* și *B. ovis* care produc numai colonii rugoase (R). Brucellele prezintă două antigene O de perete, termostabile, denumite A și M, distribuite speciilor în proporții variate. S-a mai descris și antigenul de suprafață L, asemănător celui Vi de la Salmonelle.

Nu s-au evidențiat exotoxine, dar lipopolizaharidul O posedă proprietăți toxice și pare să intervină în producerea bolii și printr-o protejare a bacteriilor față de fagocitoză. Puterea patogenă a brucellelor se bazează, mai ales, pe capacitatea de a se multiplica în interiorul macrofagelor.

Principalele căi de infecție sînt reprezentate de aparatul digestiv (ingerare de lapte sau alte alimente contaminate), mucoase și tegumente (contactul cu produsele infectate). Agentul patogen difuzează pe cale

Scanned with OKEN Scanner

limfatică, realizînd în primul rînd, un focar ganglionar, urmat de o diseminare sanguină. Boala se manifestă în această perioadă, mai ales, prin febră, deseori ondulantă. În urma fazei septicemice se pot crea focare secundare în diferite organe, cu formare de noduli granulomatoşi caracteristici, în care brucellele sînt de multe ori viabile intracelular. Bolnavul prezintă dureri articulare şi musculare, hepato-splenomegalie, uneori icter, osteomielite, meningite, transpiraţii nocturne. Infecţia are tendinţa de cronicizare, mai ales, datorită persistenţei bacteriilor în celulele granulomatoase şi macrofage; simptomele sînt, în general, nespecifice (astenie, dureri articulare, viscerale), alternînd cu perioade de sănătate aparentă. De multe ori evoluează ca un sindrom febril prelungit.

Răspunsul imun se caracterizează prin apariţia de Ig şi a stării de hipersensibilizare de tip tardiv (H.T.). Rolul antiinfecţios al Ig se adresează bacteriilor extracelulare, care pot fi astfel fagocitate sau lizate cu intervenţia C'. Prin procesul H.T. apar granuloamele caracteristice care localizează infecţia, iar macrofagele activate fagocitează brucellele. Nu poate însă fi neglijat faptul că granuloamele pot evolua uneori spre necroză sau abcedare, ceea ce creează grave complicaţii. Se observă deci că în bruceloză, ca şi în tuberculoză, evoluţia bolii este condiţionată în mare măsură de imunitate.

Starea de H.T. se poate evidenţia prin testul intradermic la brucelină, un extract de cultură bacteriană. Reacţia la brucelină, pozitivă şi la foştii bolnavi, este utilă, mai ales, pentru diagnosticul brucelozei cronice.

Ţinînd cont de faptul că bruceloza este o antropozoonoză avînd caracter de boală profesională, măsurile de profilaxie se adresează, în primul rînd, animalelor. Imunizarea cu vaccinul viu atenuat preparat din tulpina B.A. 19 *(B. abortus)* s-a dovedit eficientă. În cazul omului, imunizarea activă a fost experimentată în unele ţări, la persoanele expuse profesional, dar nu a intrat în uz curent.

3.9. GENUL STAPHYLOCOCCUS ŞI INFECŢIILE STAFILOCOCICE

Stafilococii fac parte din familia *Micrococcaceae,* care cuprinde coci grampozitivi, catalazo-pozitivi, aşezaţi în grămezi şi care se diferenţiază în mai multe genuri, dintre care menţionăm: a *Micrococus* — strict aerob şi b. *Staphylococcus* — aerob şi facultativ anaerob (tabel 3.19).

Tabel 3.19

Familia Micrococcaceae

	Genul	
	Micrococcus	Staphylococcus
Metabolism	strict aerob	facultativ anaerob
Degradarea glucozei	oxidativ	oxidativ şi fermentativ
Catalaza	+	+
Pigment	galben, roz	auriu, galben, alb
Prezenţă în organism	prezenţi uneori pe mucoase, foarte rar prezenţi în infecţii	frecvent întîlniţi pe tegumente şi mucoase pot cauza variate infecţii

Scanned with OKEN Scanner

Genul *Staphylococcus* cuprinde mai multe specii dintre care prezintă importanţă: a. *S. aureus*, în general, patogen şi b. *S. epidermidis (albus)*, în general nepatogen (tabel 3.20).

Tabel 3.20

Genul Staphylococcus — caractere diferenţiate între specii

	S. aureus	S. epidermidis
Coagulaza	+	—
Hemoliză	+	—
Pigment	auriu	alb
Degradarea manitolului	OF*	— sau O
Toxigeneză	+	—
Prezenţă în organism	prezent pe mucoase şi tegumente la purtători	face parte din microbiocenoze

* O = degradare oxidativă; F = degradare fermentativă.

Habitat. Stafilococii sînt întîlniţi în organismul uman şi animal; de asemenea, sînt larg răspîndiţi în mediul extern. *S. epidermidis* face parte din microbiocenoza nazală şi cutanată. *S. aureus* poate fi întîlnit la purtătorii sănătoşi în cavitatea nazală, în faringe, pe tegumente, în intestin. 30—40% din populaţia sănătoasă este purtătoare de *S. aureus*, aproximativ 10% fiind purtători persistenţi, care elimină timp îndelungat acelaşi lizotip, restul purtînd intermitent diverse lizotipuri. Personalul din mediul spitalicesc este purtător de *S. aureus* în proporţii ce ating 70—80%. Deci simpla prezenţă a *S. aureus* în organism nu înseamnă infecţie stafilococică.

S. aureus este considerat o bacterie oportunistă, care produce îmbolnăviri numai în anumite condiţii, care ţin de:

a. *organismul gazdă.* Infecţiile stafilococice apar cu o mai mare frecvenţă în organisme cu rezistenţa diminuată prin diverşi factori: infecţii virale preexistente (gripă, rujeolă etc.), boli cronice (diabet), leziuni tisulare (plăgi, arsuri); la cei supuşi tratamentelor îndelungate cu corticoizi, imunosupresoare, antibiotice; la cei cu boli granulomatoase cronice cu neutropenie etc;

b. *bacteria.* Este necesară implantarea în ţesuturi a unui mare număr de stafilococi (determinism cantitativ) care să elaboreze variaţi factori de agresiune, capabili să producă alterări tisulare.

Factori de patogenitate. *S. aureus* elaborează numeroşi factori de patogenitate (tabel 3.21), fiecare avînd un mecanism propriu de acţiune, condiţionînd polimorfismul clinic al infecţiilor. Fiecare factor de agresiune constituie o verigă din lanţul complex de factori, a căror acţiune se sumează *in vivo*, pentru realizarea infecţiei. Faptul că o parte a acestor factori sînt cu determinism plasmidic sau se află sub controlul bacteriofagilor temperaţi (conversie lizogenă) explică variaţiile în virulenţă observate la stafilococi.

Factorii de patogenitate au fost grupaţi în: *antigene de suprafaţă, toxine şi enzime extracelulare.*

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.21

Factorii de patogenitate ai stafilococului

Denumire	Mod de acțiune
I. Antigene de suprafață: (polizaharide și proteine din peretele celular, microcapsulă)	Rol antifagocitar: contribuie la inițierea infecției
II. Enzime extracelulare:	
— coagulază liberă:	— transformă fibrinogenul în fibrină în prezența unui activator plasmidic. Induce formarea de coaguli mici endovenoși, încărcați cu stafilococ, cu rol în diseminare;
legată:	— acționează direct asupra fibrinogenului, formînd o manta de fibrină în jurul bacteriei, cu rol antifagocitar;
— stafilokinază (fibrinoliza)	— activează plasminogenul în plasmină, care lizează fibrina. Rol în diseminarea bacteriilor prin microemboli supurați, desprinși din coagulii endovenoși infectați;
— hialuronidază	— hidroliza acidului hialuronic din țesutul conjunctiv, rol în răspîndirea bacteriilor*;
— DRN-ază RN-ază	— clivează acizii nucleici celulari; contribuie la formarea leziunilor;
— lipaze, esteraze	— metabolizează lipide cutanate, favorizînd colonizarea cu stafilococ a zonelor sebacee;
III. Toxine: — citolitice	— efecte hemolitice, leucocidale, dermonecrotice, letale;
— enterotoxine	— cauzează diarei și vărsături în toxiinfecții alimentare și enterite acute;
— exfoliativă	— induce boli cu exfoliere cutanată.

* îndeosebi la stifilococi grup fagic III.

a. *Antigenele de suprafață* sînt polizaharide acide și proteine, prezente în peretele celular, cu acțiune antifagocitară, permițînd stabilirea stafilococilor în țesuturi. Capsula, atunci cînd este prezentă, conferă bacteriilor o mare virulență pentru animalele de laborator. Este posibil ca *in vivo* capsula să apară frecvent, avînd rol în inițierea infecției, prin efectul antifagocitar. Reține atenția proteina A, cu proprietatea de a fixa porțiunea Fc a moleculelor de Ig G (regiunea Fab liberă se poate lega de antigenele specifice), permițînd diverse aplicații în imunologie (de exemplu, reacții de coaglutinare).

b. *Toxinele stafilococice* au fost separate pe baza proprietăților biologice în trei categorii: *toxine citolitice*, hemolizine și leucocidine, *enterotoxine* și *toxina exfoliativă* (tabel 3.22).

— Toxinele citolitice alterează diverse membrane celulare, ducînd la citoliză consecutivă. *Hemolizinele* se diferențiază în mai multe tipuri, notate cu alfa, beta, gamma, delta. Hemolizina α (α toxina) are efect hemolitic, leucocidal, dermonecrotic și letal. Dermonecroza, observată prin inoculări intradermice la iepure, se produce prin acțiunea asupra musculaturii netede din pereții vaselor mici, ducînd la contracții vasculare cu necroze consecutive în țesutul afectat. Acțiunea letală a fost observată accidental la om și este demonstrată prin inoculări intravenoase la ie-

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.22

Toxinele stafilococice

Tip	Mod de acțiune	Observații
1. Citolitice — hemolizine :	α hemolitic : hematii de iepure, oaie leucocidal : leucocite de om, iepure dermonecroză : letal	poate fi transformată în anatoxină
	β Acționează asupra sfingomielinei din membrana hematiilor. Determină hemoliză „cald-rece"	prezentă la stafilococi de origine animală
	γ hemoliză, citotoxic asupra limfoblastelor	
	δ hemoliză (hematii de om), citotoxic pentru neutrofile, macrofage, limfocite, plachete, Alterează mitocondrii și lizozomii celulari	
— leucocidina :	alterează PMN și macrofage, rol antifagocitar	induce anticorpi protectori
Enterotoxine :	acționează asupra terminațiilor nervoase din intestin, asupra centrului vomei și a centrului motilității intestinale	prezent la grupul fagic III
Toxina exfoliativă :	perturbă forțele de adeziune între celulele granulare din derm, cauzînd exfoliere cutanată	produsă de grupul fagic II

puri. α-toxina este antigenică, stimulînd formarea de anticorpi neutralizanți. *Leucocidinele* sînt prezente la majoritatea stafilococilor patogeni, inhibînd digerarea bacteriilor de către PMN și macrofage, avînd rol important în invazivitate.

— Enterotoxinele sînt proteine care rezistă 30 min la fierbere ca și la acțiunea enzimelor digestive. Există 6 tipuri antigenice de enterotoxine notate cu A, B, C, D, E, F, elaborate îndeosebi de stafilococi din grupul fagic III. Acționează asupra terminațiilor nervoase din intestin, impulsul transmițîndu-se apoi spre centrul motilității intestinale și spre centrul vomei. Apar vărsături abundente și diaree, care caracterizează toxiinfecțiile alimentare stafilococice și enteritele acute postantibiotice.

— Toxina exfoliativă este implicată în boli cutanate cu exfoliere, observate, mai ales, la copii. Este secretată îndeosebi de stafilococi din grupul fagic II, mai rar de grupele I și III și are determinism plasmidic.

c. *Enzimele extracelulare* contribuie la formarea leziunilor tisulare (nucleaze, lipaze, esteraze, proteaze, hialuronidaze) și la diseminarea bacteriilor în organism (stafilokinaza, hialuronidaza, coagulaza). Coagulaza este constant elaborată de stafilococii patogeni, constituind un marker fidel de apreciere a patogenității în laborator. *DRN-aza* este, de asemenea, un determinant constant de patogenitate, similar coagulazei. *Lipazele* și *esterazele,* prin metabolizarea lipidelor cutanate, permit utilizarea acizilor grași ca surse de carbon și de energie. Se observă o corelație

Scanned with OKEN Scanner

Intre capacitatea stafilococilor de a produce furuncul și secreția de lipaze, care par esențiale pentru invazia în țesutul cutanat și subcutanat.

Infecțiile stafilococice rezultă din acțiunea combinată a factorilor de patogenitate. Stafilococul poate determina o scară largă de îmbolnăviri, de la toxiinfecții alimentare, atribuite în întregime ingerării de enterotoxină, pînă la septicemii, cu diseminare masivă a bacteriilor în organism. Majoritatea infecțiilor au un caracter supurativ, stafilococul fiind prototipul de bacterie piogenă. Principalele infecții cauzate de *S aureus* sînt cuprinse în tabelul 3.23.

Tabel 3.23

Infecții cauzate de stafilococi

Infecții cutanate		Osteoarticulare	Localizări virusale	Altele
Tip	Punct de plecare			
Furuncul*	folicul pilos (cu extindere în profunzime)	*Osteomielita (frecventă la oasele în creștere)	Respirator: sinuzite, otite, pneumonii, de obicei, secundare infecțiilor virale. Rar pneumonie primară la copil mic.	Septicemii Septicopiemii
Carbuncul*	folicul pilos (focare multiple)		Urogenital: cistite, cistopielite	(cu punct de plecare din leziuni cutanate, mai rar, visceral)
Hidrosadenită*	glande sudoripare		Mastite: la femei care alăptează	
			Seroase: meningite, pleurezii, peritonite	
Panarițiu*	periunghial		Enterocolite postantibiotice	
Foliculite	folicul pilos (superficial)		Toxiinfecții alimentare	
Impetigo	leziuni cutanate veziculare			
Sindrom exfoliativ				

* Infecții stafilococice caracteristice.

Infecțiile cutanate reprezintă manifestarea majoră a stafilococilor, apărînd fie ca boli autonome, fie ca punct de plecare pentru infecții generalizate. Prototipul leziunii cutanate este *furunculul,* rezultat din invazia stafilococilor în foliculul pilos și extinderea infecției în țesutul celular subcutanat. Leziuni similare, pornind din focare multiple și extinse în profunzime, se observă în carbuncul. Stafilococii care elaborează toxină exfoliativă produc boli cutanate generalizate cu faze inițiale de eritem și faze terminale de descuamare: dermatita, buloasă exfoliativă a noului născut (boala Ritter), impetigo bulos, sindromul Lyell (necroză toxică epidermală), rashul scarlatiniform. Aceste îmbolnăviri au fost cuprinse în așa-numitul *sindrom de „piele opărită"*, avînd aspecte clinice și histologice similare.

Osteomielita este considerată, de asemenea, o infecție stafilococică majoră, apărînd deseori după diseminarea bacteriilor pe cale hematogenă din leziuni cutanate. Peste 90% din osteomielite sînt cauzate de stafilococi.

Toxiinfecțiile alimentare apar ca urmare a ingerării de alimente în care s-a elaborat enterotoxină stafilococică. *S. aureus* ocupă locul al doilea în etiologia acestor îmbolnăviri (pe primul loc fiind Salmonellele),

Scanned with OKEN Scanner

manifestate prin greţuri, vărsături abundente, diaree (fără febră), care apar după o incubaţie scurtă (2—6 ore) şi se vindecă rapid.

Enterocolitele postantibiotice apar, îndeosebi, la persoane spitalizate, supuse unor tratamente îndelungate cu chimioterapice cu spectru larg. În aceste condiţii este perturbat echilibrul microbiocenozei intestinale, selectîndu-se colonizarea cu stafilococi enterotoxigeni, achiziţionaţi din spital şi care, sînt de obicei, multiplu rezistenţi la antibiotice. Evoluţia este severă, cu mortalitate crescută. Există date după care *S. epidermidis* ar acţiona ca o bacterie oportunistă, cauzînd infecţii la cei cu mecanisme de apărare deficitare: cistite, septicemii, endocardite, meningite.

Prezintă importanţă participarea *S. aureus* în etiologia infecţiilor intraspitaliceşti care afectează îndeosebi, bolnavii cronici, nou născuţi, pe cei supuşi intervenţiilor chirurgicale etc., evoluînd uneori sub formă de epidemii. Relaţiile ecologice, care condiţionează apariţia infecţiilor intraspitaliceşti, sînt complexe. Pe de o parte, în mediul spitalicesc se selectează cu uşurinţă variante rezistente la antibiotice. Plasmidele care poartă genele de rezistenţă pot fi transferate la tulpini sensibile prin transducţie, de către bacteriofagii temperaţi. Majoritatea stafilococilor sînt lizogeni, purtînd unul sau mai mulţi profagi, care asigură acest transfer, contribuind la circulaţia tulpinilor multiplu rezistente la chimioterapice, în mediu spitalicesc.

Pe de altă parte, utilizarea intensă de antibiotice în spitale perturbă echilibrul microbiocenozelor, eliminînd populaţiile bacteriene sensibile, care sînt înlocuite cu stafilococi rezistenţi proveniţi din mediu spitalicesc. Mai trebuie adăugat că modificările ce se produc în spectrul bacteriofagilor temperaţi prezenţi la stafilococi produc variaţii ale unor caractere de patogenitate, prin conversie lizogenă) şi deci ale tabloului clinic. În urmărirea acestor tulpini de spital şi a transmiterii lor la bolnavii internaţi, un rol important a revenit lizotipiei. Prin acest procedeu s-a stabilit că într-o primă etapă, infecţiile intraspitaliceşti au fost produse îndeosebi de stafilococi de grup fagic I, care erau rezistenţi, mai ales, la penicilină, secretau lipaze, inducînd infecţii localizate, preponderent tegumentare. Ulterior, în infecţiile de spital au fost implicaţi stafilococii de grup III, care sînt multiplu rezistenţi la chimioterapice, secretă hialuronidază şi induc infecţii generalizate.

Utilizarea antibioterapiei în infecţiile stafilococice se face numai pe baza antibiogramei, avînd în vedere numărul mare de variante rezistente care circulă. În infecţiile cronice se recurge la inoculare de autovaccin, asociat cu anatoxină, procedeu care stimulează mecanismele de rezistenţă naturală (fagocitoza) şi imunitare.

3.10. GENUL STREPTOCOCCUS ŞI INFECŢIILE STREPTOCOCICE

Streptococii constituie un grup morfologic-coci grampozitivi aşezaţi în lanţuri, cu cîteva caractere metabolice comune: absenţa catalazei şi a oxidazei, reducerea nitraţilor în nitriţi, obţinerea energiei din carbohidraţi prin fermentaţie lactică, aerob-anaerob facultativi. Streptococii anaerob obligatorii (5 specii) formează genul *Peptostreptococcus* (v. bac-

Scanned with OKEN Scanner

teriile anaerob obligatorii). Cuprinzînd un număr mare de bacterii cu proprietăţi de cultură, biochimice, antigenice şi de patogenitate diferită, de la saprofiţi ai plantelor la comensali sau patogeni animali şi umani, genul alătură specii atît de diferite ca *Streptococcus pyogenes, cel mai frecvent patogen izolat din infecţiile umane* şi *Streptococcus lactis*, microorganism aproape nelipsit din lapte şi brînzeturi. Alături de frecvenţa cu care sînt izolaţi din infecţii, streptococii mai sînt cunoscuţi ca genul bacterian care produce cea mai largă varietate de manifestări clinice de boală. Explicaţia acestei realităţi este complexă şi mai comportă unele necunoscute. Astfel există o varietate mare de streptococi, mulţi dintre ei comensali, care pot coloniza diverse teritorii ale organismului, ce constituie tot atîtea porţi de intrare; tulpini din aceeaşi specie produc mai mulţi factori de patogenitate care au o participare inegală în diverse forme de infecţie; în sfîrşit, concură şi factorii genetici, condiţii de viaţă şi alimentaţie, zonă geografică.

Proprietăţile generale şi speciile mai frecvent întîlnite la om sînt prezentate în tabelele 3.24 şi 3.25. Pe baza antigenului polizaharidic C, Lancefield a reuşit să deosebească grupe de streptococi, alcătuite din una sau mai multe specii. Aceasta permite o identificare de specie mai rapidă. Totodată s-a văzut că specia cea mai importantă în patologia umană alcătuieşte un singur grup — grupul A. Urmează apoi ca importanţă, D, B, C şi G. Grupa A este însă heterogenă în ce priveşte antigenele de suprafaţă, existînd peste 60 de tipuri antigenice de proteină M. Această structură este factorul de iniţiere a infecţiei pe mucoasa faringiană (aderare) şi are proprietăţi antifagocitare. Anticorpii opsonizanţi antiproteină M conferă o imunitate de tip, de lungă durată. Tipuri antigenice s-au descris şi la alte specii de streptococ (de exemplu, în grupul B sau la pneumococ). O a doua proprietate care permite o clasificare este hemoliza. S-a descris o hemoliză β-clară, hematiile fiind lizate total, α-liză incompletă, adesea cu o tentă verzuie şi α′-liză incompletă lîngă colonie, urmată de hemoliză clară. Streptococii care nu produc liză sînt numiţi

Tabel 3.24

Proprietăţile generale ale streptococilor din infecţiile umane

Proprietăţi morfo-tinctoriale	— Coci sferici, ocazional alungiţi — Lanţuri, mai lungi în mediu lichid — Imobili, nesporulaţi — Capsulă polizaharidică la unele specii (pneumococ, viridans) — Capsulă acid hialuronic la culturi tinere de grup A
Proprietăţi de cultură	— Pe geloză sînge hemoliză (β, α); mai exprimată în anaerobioză — Pe agar simplu (enterococi) — Colonii mici
Proprietăţi biochimice	— Teste de grup (catalază, oxidază, nitratreductază, fermentare lactică) — Utile în diferenţiere (tabel 3.—25)
Proprietăţi antigenice	— Polizaharidul C în perete: grupe Lancefield (A—T) — Proteină M — fimbrii; *S. pyogenes* peste 60 tipuri — Alte proteine (T, R) şi polizaharide (clasificare tipuri) — În membrana citoplasmatică determinanţi comuni cu sarcolema şi membrana bazală glomerulară — Factori extracelulari

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.25

Specii de streptococ în patologia umană

Specie	Grup antigenic	Hemoliză	Caractere utile de diferențiere	Observații
S. pyogenes	A	β	Sensibil bacitracină	
S. agalactiae	B	β, fără*	Hidroliza hipuratului, pigment în anaerobioză	
O specie umană, două specii animale	C	β, α		
S. faecalis	D	α, fără	Se dezvoltă pe mediu bilă-esculină, la 10° și 40°, în medii cu 6,5% NaCl	În intestin uman — enterococi
S. faecium	D	α, fără		
S. durans				
Specii nonenterococi	D	α, fără	Nu se dezvoltă în medii cu 6,5% NaCl	
S. anginosus	F	α, β, fără		Microaerofili
Specii diverse	E, G, H; K—T	α, fără		
S. mutans	nu	α, fără	Nu se dezvoltă în bilă, nu sînt lizați de bilă	Streptococi viridans
S. sanguis				
S. salivarius				
S. mitis și alte specii				
S. pneumoniae	nu (tipuri antigenice, polizaharid capsular)		Lizat în bilă, sensibil la optochin	

* Streptococi tip γ.

streptococi λ'. Este o proprietate deosebit de utilă în diagnostic, pe care îl ghidează (streptococi β-hemolitici, grup A sau non-grup A etc.), întrebuințată și pentru a desemna acele specii care nu au un carbohidrat de grup, dar produc hemoliză α-streptococii viridans. Dintre aceștia se detașează o specie cu proprietăți de patogenitate deosebită de a tuturor celorlalți, datorită în primul rînd, capsulei polizaharidice — *Streptococcus pneumoniae* sau pneumococul.

Infecțiile produse de streptococi. Cu toate că din unele localizări ale infecției se pot izola atît streptococi de grup A cît și din alte grupe, *Streptococcus pyogenes* constituie o entitate etiologică bine definită, nu numai prin diversitatea de localizări și manifestări clinice, cît și prin capacitatea de a declanșa alături de îmbolnăvirile supurative și boli poststreptococice prin mecanism imun: reumatismul poliarticular acut și glomerulonefrita difuză acută. Cei mai mulți factori de patogenitate sînt cunoscuți la streptococii de grup A (tabelul 3.26). Rolul pe care îl joacă în infecția naturală este probat pînă acum numai pentru cîțiva din acești factori: proteina M este cert antifagocitară, principalul factor de virulență, toxina eritrogenă, este responsabilă de manifestările caracteristice din scarlatină. Alți factori ar putea juca un rol în invazia streptococilor în țesuturi: hemolizinele O și S ca factori antifagocitari, streptokinază

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.26

Factori extracelulari ai streptococilor β-hemolitici

Factor	Antigenitate	Proprietăţi demonstrate experimental	Efect în infecţia naturală
Toxina eritrogenă	+	trei toxine distincte antigenic; producerea toxinei A prin lizogenizare	Erupţia în scarlatină; efect piogen
Streptolizina O	+	Letală, cardiotoxică, leucotoxică; hemolitică în stare redusă; inhibată de colesterol	? Cardiotoxică ? Leucotoxică
Streptolizina S	—	Produce zona hemolitică de suprafaţă	
Proteinază şi precursori	+	Autocatalitică în condiţii reduse; necroză miocardică	? Cardiotoxică
DPN-ază	+	Leucotoxică	? Leucotoxică
Streptokinază	+	Activează proteaze plasmatice	
Hialuronidază	+	Produsă mai ales, de tipurile 4 şi 22	? Invazie în ţesuturi
DNA-ază	+	4 tipuri antigenice	

şi streptodornaze în fluidificarea puroiului, hialuronidază şi proteinază prin disocierea structurilor tisulare. Dar chiar şi atunci cînd nu este o invazie tisulară, infecţiile sînt constant asociate cu prinderea vaselor limfatice — limfagită, şi a ganglionilor regionali — adenită. Manifestările clinice şi evoluţia infecţiilor sînt condiţionate în mare măsură de poarta de intrare (tabel 3.27). Cea mai frecventă infecţie în zona temperată este

Tabel 3.27

Boli streptococice

S. pyogenes	Scarlatină: boală generală urmînd primei faringite (rar altă localizare) cu un streptococ producător de eritrotoxină (lizogenizat).
	Infecţii piogene: Infecţii la poarta de intrare — faringită: cea mai frecventă infecţie streptococică, uneori ca rinofaringită, amigdalită; 10—20% din infecţii fără simptome; răspîndire pe mucoase: sinuzite, otite medii, mastoidite.
	Infecţii piogene: Infecţii la poarta de intrare — piodermite (cutanat): impetigo etc.
	Infecţii piogene: Invazie de la poarta de intrare — cutanat: erizipel. flegmoane (după infecţia plăgilor traumatice sau chirurgicale, a abceselor de stază) — pînă la septicemie
	Infecţii piogene: Invazie de la poarta de intrare — uterin: endometrită, cu generalizarea infecţiei: febră puerperală — pînă la septicemie
	Infecţii piogene: Invazie de la poarta de intrare — faringian: adenită supurată, flegmoane, abcese pînă la meningită, abcese cerebrale
	Boli poststreptococice: — reumatism poliarticular acut — glomerulonefrită acută difuză

faringita. Infecţiile cutanate primitive, localizate în straturile superficiale ale tegumentelor, *piodermite* (impetigo ş.a.), sînt mai frecvente în zonele climatice calde şi umede (tabel 3.28), iar în zonele temperate mai ales vara. Faringita este urmată de o imunitate solidă faţă de tipul anti-

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.28

Infecții piogene la poarta de intrare

	Faringită	Piodermite
— Distribuție geografică predominantă	Zona temperată	Subtropice-tropice
— Sezon (în zona temperată)	Iarnă, primăvară	Vară, toamnă
— Vîrf de frecvență	5—15 ani	2—5 ani
— Transmitere	Contact direct (picături)	Necunoscut (insecte?)
— Boală clinică	Acută	Nedureroasă
— Tipuri sterptococice	În general, tipuri M cu număr mic	În general, tipuri M cu număr mare
— Anticorpi ASLO	Prezenți, titru mare	Rar, titru mic
— Antistreptochinaze	Prezente	Prezente
— Răspuns în anticorpi specifici de tip	În general, bun	Variabil, adesea slab
— Boli poststreptococice	Reumatism poliarticular acut, glomerulonefrită difuză acută	Glomerulonefrită difuză acută

genic infectant. *Scarlatina* este boala generală care urmează primei faringite în urma lizogenizării cu un bacteriofag, de aceea nu toate tulpinile de *S. pyogenes* sînt toxigene. Astfel, mai ales, unele tipuri M produc scarlatina, într-o anumită zonă geografică și într-o perioadă mai lungă sau mai scurtă, de ordinul anilor. Imunitatea antitoxică care urmează este de lungă durată. Ea poate fi testată prin injectarea intradermică a eritrotoxinei, reacție Dick; indivizii fără anticorpi neutralizanți vor face o reacție inflamatorie (efectul toxinei), în timp ce la acei care au anticorpi, inflamația nu se produce. În ultimul timp, s-au descris încă două tipuri antigenice de toxină eritrogenă, astfel că, teoretic un individ poate face trei scarlatine cu toxine diferite. Totuși aceste toxine sînt prezente, mai ales, la streptococii din grupele G și C, care produc mai rar infecții umane. Invazia țesuturilor urmează, mai ales, unor infecții pe o suprafață denudată — plagă cutanată, mucoasă uterină după avort sau naștere. Ea duce frecvent la *bacteriemie,* care poate fi urmată de localizări metastatice: *artrită supurativă, osteomielită, peritonită, endocardită bacteriană acută, meningită, abcese viscerale.* În sfîrșit, streptococii grup A pot produce *pneumonii, pleurezii,* ca infecții bacteriane care se asociază unei infecții virale — cu virus al rujeolei sau al varicelei.

Streptococii din celelalte grupe sînt frecvent comensali: viridans în faringe și cavitatea bucală, enterococii în tractul digestiv, probabil grupul B în tractul genital feminin, streptococii anaerobi în toate aceste teritorii. Dintre infecțiile produse de acești streptococi (tabel 3.29), cele care reținatenția prin frecvență și gravitate sînt: *meningita nou-născutului* și *septicemiile produse de streptococii grup B, endocarditele subacute* cu streptococi viridans, enterococi grup B, boli în care bacteriemia care urmează pătrunderii streptococilor în circulație (de exemplu, după extracții dentare pentru streptococii viridans), este urmată de fixare și multiplicare pe un endocard deobicei modificat prin leziuni reumatismale, leziuni ateromatoase, cardiopatii congenitale; *septicemiile cu punct de plecare uterin* — grupurile B, C, D; *infecțiile urinare* produse, mai

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.29

Principalele îmbolnăviri produse de alți streptococi

	Streptococi grup			Streptococi viridans	Pneumococi
	B	C	D		
Infecții ale căilor respiratorii superioare și mucoase învecinate (sinusuri, ureche medie)	+	+			+
Infecții primare ale căilor respiratorii inferioare (pneumonii, bronhopneumonii)					+
Diseminări bacteriene cu localizare pe:					
— endocard *(endocardită bacteriană subacută)*	+		+	+	
— meninge *(meningită)*	+ mai ales, la nounăscut		+		+
— alte seroase					
Infecții ale căilor urinare și ale tractului genital feminin	+		+		
Alte îmbolnăviri	Infecții ale plăgilor	Erizipel, febră puerperală	Infecții intraabdominale		Participare la caria dentară

ales, de enterococi și grupul B; *leziunile supurative* produse de streptococi anaerobi obligatori; intervenția unor specii de streptococi viridans în producerea *cariei dentare.*

Un rol etiologic aparte îl joacă *Streptococcus pneumoniae,* pentru care capsula reprezintă principalul factor de virulență (se cunosc peste 80 tipuri antigenice capsulare, mai frecvent fiind izolați pneumococii din primele tipuri). Cauză primară a unor infecții pulmonare — *pneumonie francă lobară,* după ce într-o anumită perioadă a fost mai rar întîlnit — pneumococul revine în patologie atît prin diverse forme clinice de îmbolnăviri pulmonare, cît și prin celelalte localizări pe mucoase (sinuzite, otite, mastoidite) sau pe seroase (meningite, peritonite, endocardite, pericardite) sau artrită supurată.

Boli poststreptococice. *Reumatismul poliarticular acut* redutabil, mai ales, prin leziunile cardiace și *glomerulonefrita acută difuză* urmează la 2—6 săptămîni după o infecție cu streptococ grup A. Deși ambele au un mecanism imun există cîteva diferențe notabile:

1. o infecție pe mucosa faringiană poate fi urmată de oricare din aceste boli, apărute cu o frecvență relativ scăzută; o infecție cutanată duce numai la glomerulonefrită;

2. infecția cu unele tipuri de streptococ (12, 4, 49, 55, 57 etc.) este urmată de un procentaj crescut de glomerulonefrită, tipuri nefritogene în timp ce oricare tip poate fi reumatogen. Explicația apariției acestor boli ar fi următoarea: streptococii de grup A au antigene comune cu fibra cardiacă (sarcolema) și antigene comune cu cele din țesutul conjunctiv, prezente în cantitate mare în valvulele cardiace (fig. 3.6.). 1). Infecția streptococică este urmată de un puternic răspuns în anticorpi față de

Scanned with OKEN Scanner

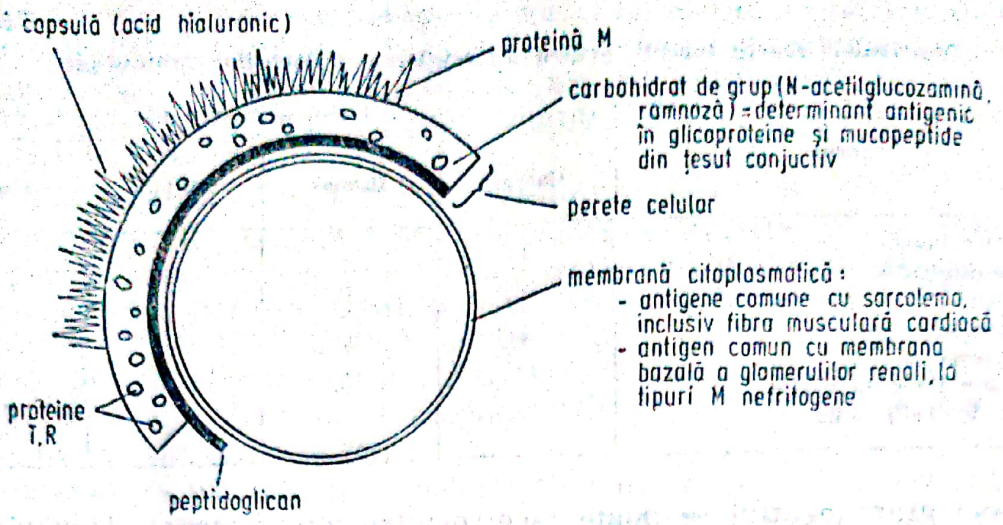


Fig. 3.6. Antigene celulare la *Streptococcus pyogenes*.

diversele componente antigenice, ceea ce se reflectă în creşterea titrului antistreptolizinelor O, antistreptokinază şi alţii. Infecţiile streptococice repetate duc la apariţia şi creşterea treptată a titrului de anticorpi anti-fibră musculară şi faţă de alte antigene comune, iar cînd, în urma unei infecţii, cantitatea de anticorpi depăşeşte un anumit prag, apar fenomenele clinice de reumatism poliarticular acut.

Glomerulonefrita s-ar datora depunerii în capilarele glomerulare a complexelor antigen-anticorpi, cu activarea complementului şi producerea de leziuni prin mecanismele hipersensibilităţii de complexe. Tipurile nefritogene au antigene comune cu membrana bazală glomerulară: în acest caz anticorpii se fixează în cantitate mare în glomeruli, unde leziunile se produc tot ca urmare a activării complementului şi a reacţiei inflamatorii subsecvente. Cu tot rolul demonstrat al anticorpilor, există tot mai multe date care implică şi factorii imunităţii mediate celular în patogenia bolilor poststreptococice. Intervenţia medicală în aceste îmbolnăviri profită de pe urma faptului că streptococul grup A şi-a păstrat sensibilitatea la penicilină G, deşi alţi streptococi au plasmide de rezistenţă multiplă transmisibile prin conjugare (de exemplu, *S. faecalis*). Este astfel posibil un tratament cu penicilină al primului atac de reumatism sau glomerulonefrită şi prevenirea agravării leziunilor la atacurile ulterioare, printr-o chimioprofilaxie adecvată.

3.11. GENUL NEISSERIA ŞI INFECŢIILE PRODUSE

Bacteriile din genul *Neisseria* sînt diplococi gramnegativi, catalazo — şi oxidazopozitivi, dintre care cei mai importanţi reprezentanţi sînt *N. gonorrhoeae* şi *N. meningitidis*, cu patogenitate bine stabilită pentru om. Au mai fost descrise bacterii comensale, cu potenţial de patogenitate în condiţii deosebite (*N. lactamicus, N. sicca, N. flavescens, N. catarrhalis* etc.). *N. catarrhalis* a fost reclasificată în ultimii ani, constituind în momentul de faţă singura specie a genului *Branhamella*. Diferenţierea unor

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.30

Principalele reacţii folosite pentru diferenţierea diplococilor gramnegativi

Specia	Reacţia de fermentare			
	Glucoza	Maltoza	Fructoza	Zaharoza
N. gonorrhoeae	+	−	−	−
N. meningitidis	+	+	−	−
N. sicca	+	+	+	+
N. mucosa	+	+	+	+
N. flavescens	−	−	−	−
Branhamella catarrhalis	−	−	−	−
Specii de Veillonella	−	−	−	−

diplococi gramnegativi se poate face, printre alte metode, şi cu ajutorul unor teste biochimice, prezentate în tabelul 3.30.

N. gonorrhoeae, strict adaptat speciei umane, se prezintă în preparatele realizate din secreţiile uretrale, ca şi diplococi reniformi, mai ales intracelulari. În primele stadii ale bolii, ca şi în cazurile cronice, gonococii pot fi şi extracelulari.

Pe mediile speciale necesare cultivării se dezvoltă 5 tipuri de colonii (T_1—T_5), distincte, în funcţie de unele antigene de suprafaţă pe care le posedă bacteriile din coloniile respective. Astfel, coloniile T_1—T_2, mici, dense, brune, cuprind gonococi cu pili, mai virulenţi, în timp ce coloniile de tip T_3—T_5 sînt mai mari, granulare, necolorate, bacteriile conţinute lipsite de pili, fiind mai puţin virulente.

Cele mai importante antigene ale gonococilor sînt asociate structurilor de suprafaţă (proteina pililor, componenta lipopolizaharidică şi proteina de membrană).

Gonoreea este o boală infecto-contagioasă cu transmitere sexuală. Bacteriile se ataşază cu ajutorul pililor de suprafaţa celulelor epiteliale ale mucoaselor, mai ales genito-urinare, pătrunzînd apoi în ţesuturile conjunctive subepiteliale şi difuzează de la celulă la celulă. La bărbaţi, rezultă, la cîteva zile de la contactul infectant, o supuraţie acută — *uretrita gonococică* ce se manifestă printr-o secreţie seroasă, care devine repede purulentă, dacă nu este tratată. Uretrita este însoţită de usturime la micţiune. În această fază, examenul microscopic al unui frotiu din secreţia uretrală permite evidenţierea diplococilor caracteristici în interiorul numeroaselor polimorfonucleare. Infecţia netratată poate evolua ascendent, interesînd prostata, veziculele seminale, epididimul, producînd variate complicaţii. La femei, infecţia evoluează deseori inaparent, cu o secreţie puţin abundentă, ceea ce creează dificultăţi în depistare; pot fi afectate în continuare glandele vestibulare, endometrul, salpingele şi chiar peritoneul.

În unele cazuri, infecţia primară poate fi urmată de invadarea sanguină, cu leziuni tegumentare, artrite, tenosinovite etc. Oftalmia noilor născuţi, o conjunctivită gravă ce poate duce la pierderea vederii, este o consecinţă a infecţiei produse cu ocazia expulzării fătului de către o mamă infectată.

Deşi în urma îmbolnăvirii s-a evidenţiat un răspuns imun concretizat prin apariţia de variaţi anticorpi, rolul protector al acestora nu a fost încă elucidat. Este posibil ca îmbolnăvirile repetate ale unei persoane să fie datorate heterogenităţii antigenelor de suprafaţă.

Scanned with OKEN Scanner

Tratamentul abuziv și nerațional cu chimioterapice selectează tulpinile multirezistente și duce la instalarea infecțiilor cronice, care devin multiple surse de infecție. Trebuie reținut și faptul că în cazul gonococilor, multirezistența este de natură plasmidică și se poate transmite prin conjugare bacteriană.

Profilaxia specifică nu a dus la rezultate concludente.

N. meningitidis posedă caractere morfotinctoriale și de cultură în mare parte asemănătoare gonococilor. Antigenul polizaharidic de suprafață (capsular) a permis clasificarea meningococilor în opt grupe antigenice (A, B, C, D, X, Y, Z, Z') și tipuri prin reacții de aglutinare. Reprezentanții primelor trei grupe sînt cei mai importanți pentru patologia umană. S-a mai descris un antigen proteic de suprafață și antigene somatice, mai puțin caracterizate.

Meningococii pătrund pe cale aerogenă în nazofaringele omului, realizînd uneori starea de portaj (5—10%). Produc în majoritatea cazurilor rinofaringite cu evoluție banală. Uneori, datorită polizaharidelor capsulare care protejează bacteriile de acțiunea fagocitelor, are loc diseminarea hematogenă **(bacteriemia),** cu febră mare și erupții tegumentare hemoragice. Cea mai gravă formă clinică rezultată din bacteriemie este localizarea meningeală — *meningita cerebrospinală epidemică,* cu debut brusc, febră ridicată, cefalee, vărsături, redoarea cefei și prognostic nefavorabil (deces, sechele), în lipsa tratamentului adecvat. Mai rar, bacteriemia poate fi urmată de artrite, pericardite și alte localizări.

În colectivitățile de copii sau adolescenți, meningita cerebrospinală poate evolua sub formă epidemică (bacteriile de grup A și C), situații în care procentajul de purtători crește mult.

Pentru profilaxia specifică, în unele țări, s-au aplicat cu succes vaccinuri preparate din polizaharidul specific de grup A și C.

3.12. FAMILIA SPIROCHAETACEAE ȘI ÎMBOLNĂVIRILE PRODUSE

Din această familie fac parte bacterii spiralate, lipsite de perete rigid, flexibile, dotate cu un aparat locomotor intracelular. Genurile *Treponema, Leptospira* și *Borrelia* cuprind specii care produc îmbolnăviri umane. Celelalte spirochete sînt prezente la animale sau în mediul extern.

3.12.1. GENUL TREPONEMA

Dintre speciile genului, trei sînt strict parazite omului, cu proprietăți patogene ridicate: *T. pallidum, T. pertenue* și *T. carateum.* În rest, au fost semnalate bacterii comensale (*T. macrodentium, T. oralae, T. vincentii* etc.), mai ales pe mucoase (cavitatea bucală, mucoasa genitală), care pot produce îmbolnăviri, îndeosebi în asociații. Astfel se pot aminti asociațiile cu anaerobi nesporulați din genul *Fusobacterium* (angina Plaut-Vincent).

Scanned with OKEN Scanner

T. pallidum este agentul etiologic al sifilisului, boală răspîndită în toată lumea. Cultivarea pe medii artificiale nu a reușit. Tulpina Reiteri (specia *T. phagedenis*), inițial patogenă pentru iepure, a putut fi cultivată scurt timp pe medii speciale, în condiții de anaerobioză. Înrudirea antigenică cu *T. pallidum* a fost utilă pentru studii serologice. Tulpina Nichols *(T. pallidum)* s-a dovedit patogenă pentru iepure, care inoculat intratesticular face orhită cu adenopatie.

Dintre antigenele *T. pallidum,* trebuie remarcat în primul rînd cardiolipidul, o haptenă prezentă la toate speciile de *Treponema,* în unele țesuturi de mamifere (cord, ficat), la alte bacterii și chiar la plante, fiind utilizat în reacțiile serologice pentru diagnostic. Antigenele proteice, specifice genului *Treponema,* sînt răspunzătoare de instalarea stării de hipersensibilitate de tip tardiv (H. T.). Au mai fost descrise antigene polizaharidice, mai puțin caracterizate, probabil specifice pentru *T. pallidum.*

T. pallidum posedă o patogenitate ridicată, datorită capacității de pătrundere prin mucoase și tegumente, urmată de o difuzare limfatică și sanguină, cu localizare în diferite organe. Infecția se transmite în majoritatea cazurilor pe cale sexuală și debutează prin apariția șancrului primar la poarta de intrare (mai ales, organele genitale), după o incubație de aproximativ 3—4 săptămîni, datorită multiplicării masive a bacteriilor. Factorii de rezistență naturală reușesc uneori să oprească procesul infecțios în acest stadiu.

Șancrul primar se prezintă ca o ulcerație mică, dură, curată, nedureroasă, în a cărei secreție se pot evidenția agenții patogeni (preparat nativ, colorații speciale). Diseminarea pe cale limfatică (adenopatia satelită) și sanguină declanșează răspunsul imun umoral și mediat celular, care împreună cu rezistența naturală, duce la vindecarea spontană a șancrului în 15—30 zile.

Sifilisul secundar corespunde unei bacteriemii treponemice, responsabilă de apariția leziunilor muco-cutanate (plăci mucoase, eroziuni, rozeole), articulare, renale, oftalmice, nervoase etc., datorate în mare parte instalării fenomenelor de HT (acumulare perivasculară de limfocite și macrofage). Răspunsul imun umoral și, mai ales, mediat celular, reușește în multe cazuri să vindece boala, cu eliminarea bacteriilor din organism. La acestea se adaugă și tratamentul cu antibiotice, aplicat în majoritatea cazurilor.

Sifilisul terțiar, inconstant și tardiv, apare la un număr redus de bolnavi, la care treponemele persistă în organe, datorită unui tratament necorespunzător sau incapacității efectorilor imunitari de a stăvili (lichida) focarul infecțios. În consecință apar leziuni necrozante (gome) la nivelul vaselor mari (anevrism aortic) sau în alte organe (tegumente, ficat, oase etc.).

O formă clinică deosebit de gravă este **sifilisul nervos** care apare deobicei după cîțiva ani de la infecția primară, mai ales, la bolnavii netratați. Se manifestă prin demență paralitică, tabes dorsal, sifilis meningo-vascular, atrofie optică etc.

Sifilisul congenital este urmarea infecției transplacentare a fătului de la mama bolnavă. Datorită depistării la timp și instituirii tratamentului eficient este din ce în ce mai rar. O parte din infecții au consecință avortul în al treilea trimestru al sarcinii. La noii născuți se observă

Scanned with OKEN Scanner

hepatosplenomegalie, icter, anemie hemolitică, localizări în organe (testicule, oase etc.), care, dacă nu duc la moartea fătului, determină sechele foarte grave.

În afara rezistenței naturale care are un rol important, mai ales, în perioada primară, imunitatea dobîndită intervine cu rol hotărîtor în limitarea sau chiar vindecarea infecției. Anticorpii IgG și IgM sînt decelabili în momentul apariției șancrului primar. Aceștia persistă mult timp în lipsa tratamentului. Dacă însă bolnavul este tratat corespunzător, IgM scad, dar IgG persistă uneori toată viața.

Imunitatea mediată celular este redusă în stadiul primar, care explică progresarea infecției la persoane care au realizat răspuns de Ac. În schimb, în fazele următoare (secundară, terțiară), efectorii imunității mediate celular contribuie la limitarea sau vindecarea bolii. Necrozarea în unele cazuri a leziunilor poate duce la efecte nefavorabile datorită fenomenelor H. T.

Imunitatea se datorește deci, mai ales, persistenței în organism a bacteriilor și inducerii imunității mediate celular. Dacă însă diagnosticul și tratamentul se introduc rapid, distrugerea agentului patogen va duce la dispariția efectului protector al infecției anterioare și, deci, este posibilă a doua infecție.

Profilaxia, bazată pe respectarea regulilor de igienă individuală, depistarea și tratarea bolnavilor, nu dispune încă de o metodă specifică.

T. pertenue produce **„framboesia"** sau **„pian"**-ul, boală endemică în regiunile tropicale din Africa, America de Sud, transmisă mai ales prin contact interuman, în urma lezării tegumentelor. Evoluția bolii seamănă cu cea a sifilisului. Infecția primară se prezintă sub forma unor leziuni ulceroase la poarta de intrare, cele secundare sînt mai profunde, interesînd tegumentele și vasele. Manifestări viscerale terțiare sînt rare.

T. carateum este agentul etiologic al unei boli ce evoluează în America Centrală și de Sud, numită „pinta", care se transmite de la om la om. Leziunile eritematose, neulcerante, mai tîrziu depigmentate, sînt prezente, mai ales, pe tegumentele mîinilor, picioarelor și a pielii păroase a capului. Interesarea viscerală este foarte rară.

3.12.2. GENUL LEPTOSPIRA

Se admite existența a două specii: *L. interrogans,* cuprinzînd bacterii patogene și *L. biflexa* cu tulpini saprofite, prezente mai ales în apele de suprafață. Cele două specii se disting prin caractere genetice, biochimice și antigenice. În cadrul speciei *L. interrogans* s-au descris numeroase tulpini, încadrate în 16 grupe și peste 150 tipuri, în funcție de caracterele antigenice. În diagnosticul de laborator se folosește, de obicei, numai determinarea de grup a leptospirei cauzatoare de boală (tabel 3.31).

Spre deosebire de treponeme, leptospirele pot fi cultivate în mod curent pe medii lichide artificiale, cu adaos de ser. Inocularea la cobai este urmată de boală experimentală, cu manifestări variate de la un tip la altul.

Structura antigenică este complexă. S-au descris antigene superficiale, de natură polizaharidică, ce diferă de la un serotip la altul, cu rol în patogenitate. Este probabil că efectul bactericid al anticorpilor spe-

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.31

Cele mai importante leptospire care intervin în patologia umană

Grupul	Boala la om	Principalul rezervor animal	Distribuția geografică
L. icterohaemorhagiae	Icter hemoragic (boala lui Weil)	Șobolan	Întreaga lume
L. canicola	Febra canină	Cîine	,,
L. pomona	Febra porcarilor	Porc, viței	,,
L. grippotyphosa	Febra de nămol	Șoarece de apă	,,
L. bataviae	Febra de cîmp	Șobolan, șoarece	Europa, Asia de Sud, Japonia, Africa
L. sejroe	Febra de cîmp	Șoarece de cîmp	Europa
L. hyos (mitis)	Febra porcarilor	Porc	Europa, America, Australia

cifici și complementului C′ să aibă rol de protecție împotriva infecției. Antigenii de perete, mai profunzi, care conțin și o componentă proteică, sînt comuni cu cei ai serotipurilor de *L. biflexa,* ceea ce a permis prepararea de antigene specifice de gen pentru diagnostic *(L. biflexa-patoc).*

Rezervorul natural este reprezentat de numeroase animale sălbatice sau domestice, care fac boala aparentă sau inaparentă (tabel 3.31). La om, infecția cea mai gravă (dar nu cea mai frecventă) este icterul hemoragic (boala lui Weil), produs de *L. icterohaemoragiae.* Transmiterea se face prin tegumente, mucoase, uneori apă și alimente contaminate. Este posibil ca mișcările caracteristice și mobilitatea mare să permită pătrunderea prin tegumente și mucoase intacte. În continuare au loc difuzarea sanguină și localizări viscerale. Bolnavul prezintă febră, semne meningiale, icter, hemoragii, alterări ale funcțiilor renale. Este posibilă o recidivă după cîteva zile de aparentă vindecare.

Agenții patogeni din celelalte grupe produc deobicei îmbolnăviri mai ușoare, deseori cu interesarea aparatului renal, prin care se elimină agentul patogen din organism. Uneori se înregistrează cazuri asimptomatice (cu răspuns imun).

După infecție se instalează imunitatea umorală specifică de grup, care durează cîțiva ani.

Vaccinurile inactivate aplicate animalelor și persoanelor din zonele endemice au acordat protecție de grup.

3.12.3. GENUL BORRELIA

Spirochetele din acest gen sînt agenți patogeni ai unor boli infecțioase transmise omului prin înțeparea unor artropode hematofage. Ținînd cont de faptul că gazdele naturale sînt reprezentate de animale sălbatice și domestice, ca și de intervenția artropodelor, este ușor de înțeles repartiția geografică a agenților patogeni și a infecțiilor respective. În funcție de gazdă și, mai ales, de insectele care condiționează aspectele epidemiologice, se disting *Borrellii* transmise prin păduchele de corp *(B. recurrentis)* și altele prin căpușe, mai cu seamă din genul *Ornithodoros (B. duttonii, B. hispanica, B. caucasica, B. hermsii* etc.).

Scanned with OKEN Scanner

Se cultivă destul de greu pe medii complexe, în condiții de anaerobioză sau de microaerofilie.

Cea mai importantă manifestare clinică este **febra recurentă** produsă de *B. recurrentis*, răspîndită în toată lumea, epidemică mai de mult, rară acum.

După pătrunderea agentului patogen pe cale cutanată (leziuni de grataj) sau prin mucoasa conjunctivală are loc diseminarea hematogenă, cu localizarea în multiple organe. Bolnavul prezintă febră ridicată, cefalee, mialgii, artralgii, greţuri, vărsături, hepatosplenomegalie, deseori icter, care durează aproximativ o săptămînă. După cîteva zile de apirexie, ciclul termic revine cu aceeaşi simptomatologie şi prezenţa abundentă a bacteriilor în sînge. În lipsa tratamentului, după cîteva asemenea cicluri, se instalează decesul.

Recăderile se datoresc faptului că *B. recurrentis* suferă variaţii antigenice importante chiar în corpul gazdei. Ca atare anticorpii produşi nu pot acţiona asupra tulpinilor ce posedă noi antigene şi va avea loc recăderea.

Îmbolnăvirile produse de celelalte *Borrellii,* limitate la anumite zone geografice, sînt, în general, asemănătoare, dar mai puţin severe: pot evolua uneori epidemic.

Nu s-au realizat mijloace de profilaxie specifică.

3.13. GENURILE RICKETTSIA ŞI CHLAMYDIA.

3.13.1. RICKETTSIILE

Sînt bacterii de dimensiuni mici, cuprinzînd un mare număr de specii, care parazitează diferite gazde. Rezervorul natural îl constituie unele mamifere şi insecte artropode, care au rol şi de vector.

Multă vreme rickettsiile au fost considerate înrudite cu virusurile sau forme de trecere de la bacterii spre virusuri, datorită dimensiunilor mici şi parazitismului obligator celular. Astăzi s-a stabilit că rickettsiile sînt bacterii, avînd planul de organizare şi structura celulei procariote, precum şi alte atribute ale bacteriilor: au perete celular în care se evidenţiază acid muramic, citoplasma conţine ribozomi şi alte organite celulare, au ADN şi ARN în aceiaşi proporţie ca în alte celule bacteriene (la virusuri nu există concomitent ambii acizi nucleici), posedă enzime numeroase capabile să degradeze diverse substraturi, să formeze legături înalt energetice, să participe în biosinteza proteinelor, lipidelor etc., — se multiplică prin fisiune binară, sînt înhibate de unele antibiotice (Tetraciclină, Cloramfenicol), care nu au efect antiviral.

Parazitismul intracelular se explică prin permeabilitatea excesivă a membranei citoplasmatice, care nu poate reţine unii metaboliţi esenţiali în celula bacteriană. Dezvoltarea intracelulară înlătură acest defect.

Rickettsiile au formă cocoidă sau cocobacilară, cu diametrul de 300 nm. Sînt imobile; uneori se observă o capsulă. Se colorează prin colorații speciale: Giemsa, Machiavello, Giemenez. Cultivă abundent în sacul vitelin al oului embrionat de 5—7 zile, procedeu utilizat în preparări de antigene şi vaccinuri. Inocularea intraperitoneală la cobai duce

Scanned with OKEN Scanner

la o boală febrilă ce poate evolua spre vindecare sau moarte; unele rickettsii cauzează leziuni scrotale. Se mai pot cultiva în culturi de celule neproliferative, iar *R. quintana* crește pe medii acelulare, ce conțin sînge, prin incubare în atmosferă de CO_2. Rickettsiile au mai multe antigene: a. un antigen solubil, specific de grup; b. un antigen corpuscular cu specificitate de tip; c. un antigen polizaharidic comun cu *B. proteus* OX_{19}, OX_2 sau OX_K (lipsind la *R. burneti* și la *R. quintana)* pe care se bazează reacția Weil-Felix, utilizată în diagnostic.

Rickettsiile eliberează hemolizine al căror rol nu este încă precizat și conțin toxine asemănătoare endotoxinelor bacililor gramnegativi, care produc în cîteva ore moartea animalelor inoculate.

Îmbolnăvirile cauzate, numite **rickettsioze.** sînt în general zoonoze, cu excepția tifosului exantematic și a febrei de tranșee, care sînt boli specific umane. Clinic evoluează ca febre exantematice, adică boli febrile însoțite de erupții cutanate și tulburări nervoase (stare tifică); excepție face febra Q care este o pneumonie interstițială. Pe baza unor criterii bacteriologice, clinice și epidemiologice rickettsiozele au fost clasificate în mai multe grupe (tabel 3.32).

Transmiterea rickettsiilor de la om la om sau de la animale la om se face prin artropode vectoare: păduche, purece, căpușă. Pentru *R. burneti* nu este obligatorie prezența vectorului, se poate transmite prin aerosoli sau alimente infectate. După pătrunderea în organism, rickettsiile se multiplică în celulele endoteliale ale vaselor mici în care apar tumefieri, necroze, tromboze vasculare, cu diferite consecințe. Leziunile sînt mai pronunțate în piele (explicînd erupția), dar pot apare și în organele interne: SNC, cord etc. Uneori persistă modificări vasculare timp îndelungat.

Pentru zona noastră geografică prezintă importanță rickettsiozele din grupul tifos, febra butonoasă și febra Q.

Tifosul exantematic (epidemic, clasic), cauzat de *R. prowazeki* are ca vector păduchele de corp și de cap, boala fiind frecventă în condiții ce favorizează parazitismul (standard redus de igienă personală, război etc.). Deparazitarea a redus considerabil incidența acestei boli. Clinic se manifestă prin febră, erupție cutanată, cefalee, prostrație, hepatosplenomegalie. Boala este mai severă la adulți și vîrstnici. În epidemie mortalitatea este de 10—30%. În prezent tifosul exantematic se întîlnește sub formă de *t fos de recădere* (boala lui Brill), care apare prin exacerbarea *R. prowazeki,* care a persistat timp îndelungat în organism la foști bolnavi de tifos de păduche. În tabelul 3.33 sînt redate unele criterii de diferențiere a celor două forme de îmbolnăvire.

Tifosul endemic, cauzat de *R. typhi (R. mooseri),* are tablou clinic asemănător tifosului exantematic, dar evoluția este mai discretă, mortalitatea fiind excepțională.

Febra Q este întîlnită mai frecvent decît alte rickettsioze în perioada actuală. Agentul etiologic diferă prin unele proprietăți de celelalte rickettsii, motiv pentru care s-a propus separarea sa într-un gen aparte, *Coxiella. Coxiella burneti* prezintă o rezistență crescută față de agenții mediului înconjurător, ceea ce explică transmiterea și pe alte căi decît prin vector (pulberi infectate, alimente). Nu prezintă înrudiri antigenice cu *B. proteus.* Omul se infectează, de obicei, de la animale (bovine), la care *C. burneti* determină avort cu eliminarea masivă de bacterii în

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.32

Rickettsioze

Grup	Boli cauzate	Agent etiologic	Localizare în celulă	Vector	Rezervor	Înrudire cu *B. proteus*	Răspîndire geografică
I. Grup tifos	— Tifos exantematic (epidemic)	R. prowazeki	citoplasmă	păduche	om	OX_{19}	toată lumea
	— Boala Brill	R. prowazeki	citoplasmă	—	om (fost bolnav)	OX_{19} (slab)	„
	Tifos endemic (murin)	R. typhi (mooseri)	citoplasmă	purece	şobolan	OX_{19}	„
II. Grupul febrelor pătate	— Febra pătată a Munţilor Stîncoşi	R. rickettsii	nucleu + citoplasmă	căpuşă	rozătoare	OX_2 OX_3	America
	— Febra butonoasă	R. conorii	nucleu + citoplasmă	căpuşă	ciine, rozătoare		Bazin mediteranean, Africa, India
	— Rickettsioza varicelliformă	R. akari	nucleu + citoplasmă	purece	şoarece	OX_2	URSS, America de Nord
	— Rickettsioza siberiană	R. sibirica	nucleu + citoplasmă	căpuşă	rozătoare	OX_2	Asia de Nord
	— Rickettsioza australiană	R. australis	nucleu + citoplasmă	căpuşă	marsupiale	OX_2	Australia
III. Febra tsutsugamushi	— Febra orientală	R. tsutsugamushi	citoplasmă	larve de acarieni	rozătoare	OX_k	Asia Australia
IV. *Febra Q*	Febra Q	Coxiella burnetti	citoplasmă	căpuşă, direct la om	rozătoare animale domestice	—	Toată lumea
V.	— Febra de tranşee	R. quintana	extracelular	păduche	om	—	Toată lumea (război)

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.33

Diferenţierea între tifosul clasic şi boala lui Brill

	Tifosul exantematic	Boala lui Brill
Agent etiologic	R. prowazeki	R. prowazeki
Vector	păduche	—
Clinic	forme grave, mortalitate crescută	forme uşoare la foşti bolnavi de tifos exantematic
Reacţia Weil-Felix	pozitiv din prima săptămînă de boală	negativă
Rfc	se pozitivează mai tîrziu decît Weil-Felix	pozitivă la titru mare din primele zile de boală
Clase de Ig	titruri mari de Ig M	Ig G la titruri mari din primele zile de boală

mediul înconjurător. Infecţia umană evoluează ca o pneumonie interstiţială, apărînd mai frecvent la personalul care lucrează în fermele de animale.

Febra butonoasă, cauzată de *R. conorii* este întîlnită în bazinul mediteranian, Africa, India. La noi în ţară s-a descris mai ales în Dobrogea. *R. conorii* este transmisă la om prin căpuşa de cîine. La locul înţepăturii apar leziuni cutanate maculo-papulare.

Tratamentul rickettsiozelor se face cu antibiotice cu spectru larg: Tetraciclină, Cloramfenicol. Profilaxia se realizează prin acţiuni de deparazitare şi deratizare. În anumite condiţii se practică vaccinarea cu vaccinuri inactivate sau vaccinuri preparate din rickettsii vii cu virulenţa atenuată.

3.13.2. GENUL CHLAMYDIA

(Denumiri anterioare: virusuri bazofile, Bedsonii, Myiagavanella)

Cuprinde bacterii de dimensiuni mici, manifestînd parazitism obligatoriu intracelular şi avînd un ciclu de dezvoltare particulară. Infectează frecvent păsările şi mamiferele. La om cauzează îmbolnăviri oculare, genitale, pulmonare.

Multă vreme au fost considerate virusuri mari, datorită parazitismului, intracelular şi filtrabilităţii. Astăzi este stabilit că chlamydiile sînt bacterii cărora le lipsesc mecanismele de generare a compuşilor înalt energetici (ATP). De aceea sînt etichetate ca „paraziţi energetici", fiind restrînse la o existenţă intracelulară, celula gazdă furnizînd energia necesară. Au fost separate două specii: *C. trachomatis* şi *C. psittaci* care diferă prin proprietăţi antigenice, sensibilitate la sulfonamide, producere de incluzii intracelulare etc. (tabel 3.34).

Chlamydiile sînt bacterii imobile, asemănătoare ca structură cu bacteriile gramnegative, la care se întîlnesc două tipuri de celule:

— celule mici, sferice, cu diametrul de 250—300 nm, care conţin un nucleoid compact, perete celular dens şi au o activitate metabolică

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 3.34

Proprietăţi generale ale Chlamydiilor

Proprietăţi	*C. trachomatis*	*C. psittaci*
Incluzii	— compacte, cu o matrice de glicogen. Densitate redusă de „corpi elementari" — se colorează cu iod	— difuze, fără matrice de glicogen. Densitate mare de „corpi elementari" — nu se colorează cu iod
Sensibilitate la sulfadiazină Sensibilitate la cicloserină	+ +	— —
Infecţii produse la om	Trahom Conjunctivită cu incluzii Limfogranulomatoză venerianã Infecţii respiratorii	Pneumonie atipică
Specii parazitate	Parazit strict uman	Foarte răspîndit la păsări şi mamifere

redusă. Acestea sînt forme puternic infecţioase, stabile, extracelulare, numite „corpusculi elementari";

— celule mari, cu diametrul de 800—1200 nm, fără nucleoid dens, cu perete celular lax, foarte active metabolic, situate intracelular, acestea constituind forme de replicare ale *chlamydiilor,* denumite „corpi iniţiali" sau corpi reticulaţi".

Ambele forme se colorează prin coloraţii speciale: Machiavello, Giemenez, Giemsa. Ciclul de dezvoltare are loc în citoplasma celulei gazdă şi începe odată cu pătrunderea, printr-un proces de endocitoză, a corpusculului elementar, care reprezintă unitatea infecţioasă. Corpusculul elementar inclus în fagosomi rezistă la digestia prin enzime lizozomale. Sintezele bacteriene desfăşurate intracelular duc la rearanjarea celulei bacteriene spre o formă mare, corpul reticulat, cu infectivitate joasă. După o perioadă de lag de aproximativ 12 ore, forma reticulată se divide repetat prin fiziune binară şi apoi se condensează spre „corpi elementari" mici, puternic infecţioşi. Ciclul durează 24—48 ore. În celula infectată apar incluziile, care reprezintă microcolonii bacteriene, conţinînd corpi reticulaţi şi corpi elementari. Incluziile se dispun în jurul nucleilor celulari ca o manta („chlamidă"). *C. trachomatis* formează incluzii compacte cu o matrice de glicogen, pe cînd la *C. psittaci* incluziile sînt mai difuze şi lipsite de matricea de glicogen. Celula gazdă cu incluzii se rupe, corpii elementari sînt eliberaţi şi capabili de a începe un nou ciclu infecţios.

Cultivarea este posibilă numai în celula vie. Toate chlamydiile cultivă uşor în sacul vitelin al oului embrionat de 6—8 zile. Se pot dezvolta şi în culturi de celule (de exemplu, Mc Coy) sau prin inoculare la animale de laborator (şoarece).

În structura antigenică există un antigen de grup, fixator de complement, de natură lipopolizaharidică, termostabil, comun tuturor chlamydiilor.

Scanned with OKEN Scanner

Antigene specifice, proteice, termolabile, prezente la un număr limitat de chlamydii, pot fi detectate prin imunofluorescență. Efectele toxice ale clamydiilor sînt asociate cu antigene care pot fi neutralizate prin antiseruri specifice. Specia *C. trachomatis* este patogenă pentru om, producînd infecții oculare (trachomul și conjunctivita cu incluzii), genitale (uretrite, limfogranulomatoza veneriană) și respiratorii.

Trahomul este o keratoconjunctivită cronică cu hipertrofie foliculară, panus, ulcerații corneene, care se cicatrizează, ducînd final la orbire. Trahomul este răspîndit, mai ales, în Orientul Mijlociu și Africa și este considerat principala cauză de orbire în lume.

Conjunctivita cu incluzii și **uretrita:** unele tipuri de *C. trachomatis* cauzează boli transmise sexual, care pot fi transferate și la conjunctivă. La bărbați infecția apare ca o uretrită, iar la femei ca salpingite și cervicite, care se pot manifesta clinic sau rămîn asimptomatice. Se apreciază că peste 50% din uretritele negonococice sînt cauzate de chlamydii. Infecția genitală poate fi transmisă la ochi, prin autoinoculare, manifestîndu-se la adulți ca o conjunctivită cu incluzii; noul născut poate contracta în timpul nașterii, de la mama infectată, o conjunctivită cu secreție mucopurulentă. Conjunctivita cu incluzii poate fi însoțită uneori de rinite, faringite, otite la adulți, sau pneumonie gravă la noul născut.

Limfogranulomatoza inghinală benignă, cauzată de unele tipuri de *C. trachomatis*, este o boală cu transmisie sexuală, frecventă în zonele tropicale și temperate. Leziunile genitale sînt însoțite de adenită regională supurativă, uneori și de simptome generale: febră, rash, artrită, conjunctivită, meningoencefalită.

Specia C. psittaci este patogenă pentru numeroase specii de păsări și mamifere. Cauzează **psittacoza** la papagali și **ornitoza** la alte păsări, manifestîndu-se prin diaree, emaciere, secreție nazală purulentă. Omul, infectat pe cale respiratorie de la păsările bolnave, face o pneumonie interstițială cu evoluție severă. Alți reprezentanți ai speciei *C. psittaci* determină infecții la bovine, ovine, caprine, porcine, cu avort enzootic, enterite, pneumonite, artrite, encefalomielite.

Au fost izolate chlamydii de la om, din sindromul Reiter (artrită, uretrită, conjunctivită).

Infecțiile produse de chlamydii pot fi tratate cu antibiotice cu spectru larg (de exemplu, tetraciclină).

3.14. MYCOPLASMELE

Mycoplasmele sînt larg distribuite în natură parazitînd omul, diverse specii animale și plante, unele fiind saprofite. Mycoplasmele sînt cele mai mici bacterii capabile să se dezvolte autonom pe medii de cultură acelulare, unitatea minimă reproductivă fiind o celulă sferică cu diametrul de 330 nm. Se caracterizează printr-un pleomorfism accentuat (forme sferice, cocobacilare, filamente), datorită lipsei peretelui celular, motiv pentru care au fost incluse în clasa *Mollicutes (mollis cutis*= perete moale). Majoritatea mycoplasmelor necesită colesterol ca factor

Scanned with OKEN Scanner

de creştere, pe care îl incorporează în membrana citoplasmatică. Un grup de mycoplasme care se dezvoltă în prezenţa ureei au fost definite ca *Ureaplasma urealyticum* (anterior numite mycoplasme T), iar mycoplasmele care se dezvoltă în absenţa colesterolului au fost separate în genul *Acholeplasma*, întîlnit în infecţii la animale.

Glicolipide din membrana citoplasmatică au rol de antigen fixator de complement. Mycoplasmele au mare afinitate pentru membranele celulare în ţesuturile animale infectate.

Mycoplasmele umane au afinitate pentru tractul respirator, uro-genital şi pentru sinoviale. În tabelul 3.35 sînt enumerate principalele mycoplasme care parazitează omul şi unele proprietăţi ce le caracterizează.

Tabel 3.35

Mycoplasme umane

	Sediu		Degradarea			Metabolism		Hemoliză
	Tract respirator	Tract genito-urinar	glucozei	arginei	ureei	aerob	anaerob (micro-aerofil)	
M. salivarium	+	−	−	+	−	−	+	−
M. orale	+	−	−	+	−	−	+	−
M. pneumoniae	+	−	+	−	−	++	−	+
M. hominis	rar +	+	−	++	−	++	+	−
M. fermentans	−	rar +	+	+	−	−	+	−
Ureaplasma	rar +	+	−	−	++	−	+	−

În mecanismul de producere al îmbolnăvirilor un rol important se atribuie constituenţilor membranei citoplasmatice a mycoplasmelor. Proteine membranare, din zone specializate, ar fi responsabile de ataşarea bacteriilor pe receptorii de la suprafaţa celulelor gazdă. La *M. pneumoniae* s-a observat o puternică aderenţă de parenchimul pulmonar, datorită unei structuri alungite, ca un ac, care este inserată în celule pentru a injecta diferite enzime şi a prelua factori nutritivi, putînd merge pînă la depletiţia celulei de aminoacizi, purine, pirimidine etc. S-a sugerat că peroxidul de hidrogen produs de *M. pneumoniae* contribuie la alterările tisulare. Unele enzime membranare ale mycoplasmelor (proteaze, fosforilaze) modifică suprafaţa celulelor animale, afectînd permeabilitatea, activitatea cililor epiteliali sau antrenează liza celulei. Efecte asemănătoare sînt obţinute şi prin acţiunea amoniacului eliberat de către *Ureaplasma*. Mycoplasmele pot modifica antigenitatea celulei gazdă, stimulînd procese de autoagresiune, cu producere de anticorpi faţă de componente celulare proprii, ceea ce explică diferite complicaţii ce apar în unele infecţii.

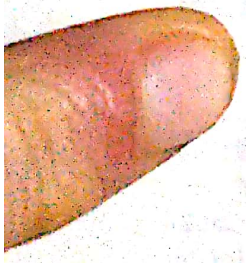
Principalele îmbolnăviri cauzate la om sînt:

Pneumonia atipică primară (PAP) determinată de *M. pneumoniae*. Boala evoluează ca o pneumonie interstiţială cu tuse seacă, uneori cu caracter paroxistic, însoţită de faringită, cefalee, mialgii. Pot apare complicaţii neurologice (encefalite, meningite), erupţii cutanate, miocardite etc., prin mecanisme de autoagresiune. *M. pneumoniae* alterează şi suprafaţa hematiilor, eliberînd aglutinogen I, faţă de care se formează anticorpi, detectaţi prin reacţia de hemaglutinare la rece. PAP afectează

de obicei, tinerii (5—15 ani), putînd cauza 20—40% din pneumoniile „atipice". Focare epidemice se observă în colectivităţi (armată). După trecerea prin boală apar anticorpi serici fixatori de complement şi Ig A secretorii, dar rolul principal în protecţia faţă de reinfecţie revine imunităţii mediate celular.

Infecţii uro-genitale: deşi mycoplasme pot fi izolate din tractul uro-genital şi de la persoane aparent sănătoase, se apreciază că au rol etiologic în 20—30% din infecţii uro-genitale, cu transmisie venerianã. Rolul principal îl deţine *Ureaplasma*, mai rar *M. hominis* sau *M. fermentans*. La bărbaţi infecţiile apar ca uretrite acute negonococite, uretrite subacute, prostatite, cistite hemoragice, fiind implicate şi în sterilitate. La femei întîlnim cervicite, vulvo-vaginite, bartholinite, avorturi repetate şi septicemii postabortum.

Deşi nu există suficiente argumente, au fost implicate în **artrite** şi în **sindromul uretro-conjunctivo-sinovial.** Tratamentul cu Tetraciclină şi Eritromicină este de elecţie în infecţiile cu mycoplasme.



Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4
VIRUSOLOGIE

4.1. PROPRIETĂŢILE GENERALE ALE VIRUSURILOR

Epoca de pionerat a bacteriologiei a pus problema existenţei unor boli contagioase produse de agenţi care se deosebesc de bacterii prin dimensiune (nu se văd la microscop, trec prin filtrele care reţin bacteriile) şi lipsa cultivării pe medii inerte, deşi se multiplică uşor în organismul viu. Pasteur a realizat primul model experimental al unei infecţii virale, infecţia rabică la iepure (1881). Mai tîrziu astfel de agenţi au fost identificaţi la plante (virusul mozaicului tutunului, de către Ivanovski şi Beijerinck), la animale (virusul febrei aftoase a bovideelor, de către Löeffler şi Frosch), precum şi la bacterii (d'Hérèlle — Twort) etc.

Spre deosebire de alţi agenţi infecţioşi, virusurile nu au organizare celulară, unele dintre ele fiind formate numai din acid nucleic şi proteine (nucleocapside); unitatea morfologică de virus se numeşte *virion*. Lipsite de metabolism, virusurile sînt incapabile de multiplicare independentă de celula vie. Aceste entităţi biologice au un caracter dual:

1. pe de o parte virionul, formă de existenţă extracelulară, particulă matură infecţioasă (pachet de gene), ansamblu complex structurat de macromolecule. Cutia proteică de înveliş a acidului nucleic (capsidă) este formată din cîteva tipuri de polipeptide repetate într-o aranjare simetrică;
2. pe de altă parte, programul genetic introdus în celula infectată ca acid nucleic viral, care se adaugă sau înlocuieşte total programul ereditar al celulei parazitate.

Virusurile se pot defini, într-o formulare puţin modificată faţă de aceea originală a lui Lwoff, ca entităţi infecţioase caracterizate prin:

— genom reprezentat fie de ADN, fie de ARN;
— parazitism absolut: virionul, inert metabolic, nu creşte şi nu se divide; formarea de noi virioni are loc numai în celula vie;
— parazitism la nivel genetic: multiplicarea virală o realizează celula infectată pe baza informaţiei aduse de acidul nucleic viral;
— structură a nucleocapsidei aparţinînd unui tip determinat de simetrie elicoidală sau cubică;
— posibilitatea ca genomul sau părţi din genomul viral să fie integrate în cromozomii celulei parazitate, ca provirus.

4.1.1. COMPOZIŢIA CHIMICA A VIRIONULUI

Principalele macromolecule din virion sînt acidul nucleic şi proteinele (tabel 4.1). Pentru virusurile alcătuite numai din acid nucleic şi capsidă proteică, virionii sînt nucleocapside neînvelite. Virusurile în-

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.1

Compoziția chimică a virionilor

Familii de virusuri	Acid nucleic			Proteină	
	Greutate moleculară × 10^6	Configurație	Infecțiozitate	Tipuri polipeptide diferite	Transcriptază
Virusuri cu ADN					
Parvoviridae	2	mc—l	+	3	—
Papovaviridae	3—6	dc—c; Superhelicoidale	+	6	—
Adenoviridae	20—30	dc—l	+	10	—
Herpetoviridae	100	dc—l	+	24	—
Poxviridae	160	dc—l	—	30	+
Virusuri cu ARN					
Picornaviridae	2—3	mc—l	+⁰	4	—
Togaviridae	4	mc—l	+⁰	3	—
Bunyaviridae	6	mc—?	—*	3	+
Orthomyxoviridae	5	mc—l s(8)	—*	7	+
Paramyxoviridae	7	mc—l	—*	6	+
Rhabdoviridae	4	mc—l	—*	7	+
Reoviridae	12—15	dc—l s(10—11)	—*	7	+
Retroviridae	6×2	mc—l s(2)	+ ADN	7—8	revers
Arenaviridae	5	mc—?	?*	?	?
Coronaviridae	6	mc—l	?*	16	+

Legendă: dc = dublu catenar; mc = monocatenar; l = liniar; c = circular; s = segmentat (număr de fragmente); *o* = virusuri ARN cu catenă pozitivă — poate fi utilizată ca ARNm; * = v.ARN cu catenă negativă; ARN nu poate fi utilizat ca ARN m. Pentru inițierea infecției au nevoie de o enzimă de transcriere în ARNm.

velite mai au în exteriorul nucleocapsidei unul sau mai multe învelișuri lipoproteice (peplos). Polizaharidele se găsesc, mai ales, sub formă de glicoproteine.

Acidul nucleic reprezintă 1—25% din greutatea virionului; constituie genomul viral. Structura și organizarea genetică interesează pentru înțelegerea strategiei genomului viral: dublu catenar sau monocatenar, liniar sau circular, segmentat sau într-o singură moleculă. În ultimul timp s-a văzut că virusurile animale cu ADN constituie un model de organizare a materialului genetic la eucariote.

Proteinele virionale majore alcătuiesc un înveliș protector al acidului nucleic, monostratificat sau pluristratificat. Prin aranjarea lor simetrică ele conferă caracteristicile arhitecturale de bază ale virionului. Capsida este formată numai din proteine; subunitatea care se repetă simetric este denumită *subunitate de structură, subunitate biochimică* sau *protomer* și este un bloc format din unul sau mai multe polipeptide diferite. Capsida poate veni în contact direct cu firul de acid nucleic (în general, la virusurile cu simetrie elicoidală) sau alcătuiește o cutie

Scanned with OKEN Scanner

de formă icosaedrică în interiorul căreia este pliat acidul nucleic (virusuri cu simetrie cubică). În acest caz acidul nucleic poate fi asociat cu proteine interne formînd un sîmbure (core). Unele virusuri („învelite") au peste capsidă un înveliș lipoproteic (peplos sau anvelopă), în general alcătuit din trei straturi: intern proteic, intermediar lipidic și extern — blocuri de glicoproteine (peplomeri) care proemină din stratul lipidic. Mai pot exista proteine minore (cîteva molecule/virion), de exemplu, transcriptaze. Proteinele virionale alcătuiesc un înveliș protector al acidului nucleic, inițiază multiplicarea în celula infectată, participă la asamblarea și maturarea virionului, constituie antigenele de suprafață sau interne ale virusurilor.

Lipidele sînt prezente în pelpos, provin din membranele celulare infectate și sînt alcătuite din amestecuri de lipide neutre, fosfolipide și glicolipide, în proporții asemănătoare celor din membranele celulare. Virusurile învelite sînt sensibile la solvenți ai lipidelor. Uneori se găsesc în cantitate foarte mare (30% din greutate la togavirusuri sau retrovirusuri).

4.1.2. ARHITECTURA VIRIONULUI

Structura particulei virale este studiată, mai ales, prin cristalografie cu raze X pe preparate cristalizate și cu ajutorul microscopului electronic.

Structura de bază în alcătuirea virionului o constituie **nucleocapsida.** Subunitățile care se repetă se pot așeza după două moduri de simetrie (elicoidală și cubică), simetrii de rotație — corpul este simetric în spațiul tridimensional față de o axă de simetrie.

Simetria elicoidală (sau în șurub): subunitățile se repetă pe o spirală, fiind simetrice față de o axă care trece în lungul helixului; ele vin în contact strîns cu acidul nucleic dispus în spirală (fig. 4.1).

Pentru nucleocapsidele elicoidale, protomerul constă dintr-un singur tip de polipeptid. Împachetarea subunităților poate fi rigidă conferînd virionului forma unui bastonaș (de exemplu, V.M.T.) sau laxă, astfel că nucleocapsida poate fi înghemuită și acoperită de un peplos, ceea ce conferă virionului o formă aproximativ sferică.

Simetria cubică: subunitățile alcătuiesc o cutie care are forma

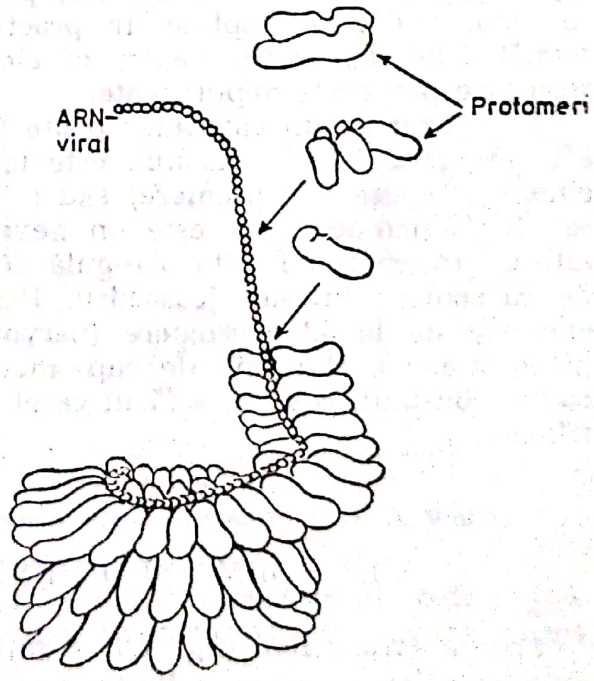


Fig. 4.1. Schema de structură a unui virus cu simetrie elicoidală (virusul mozaicului tutunului).

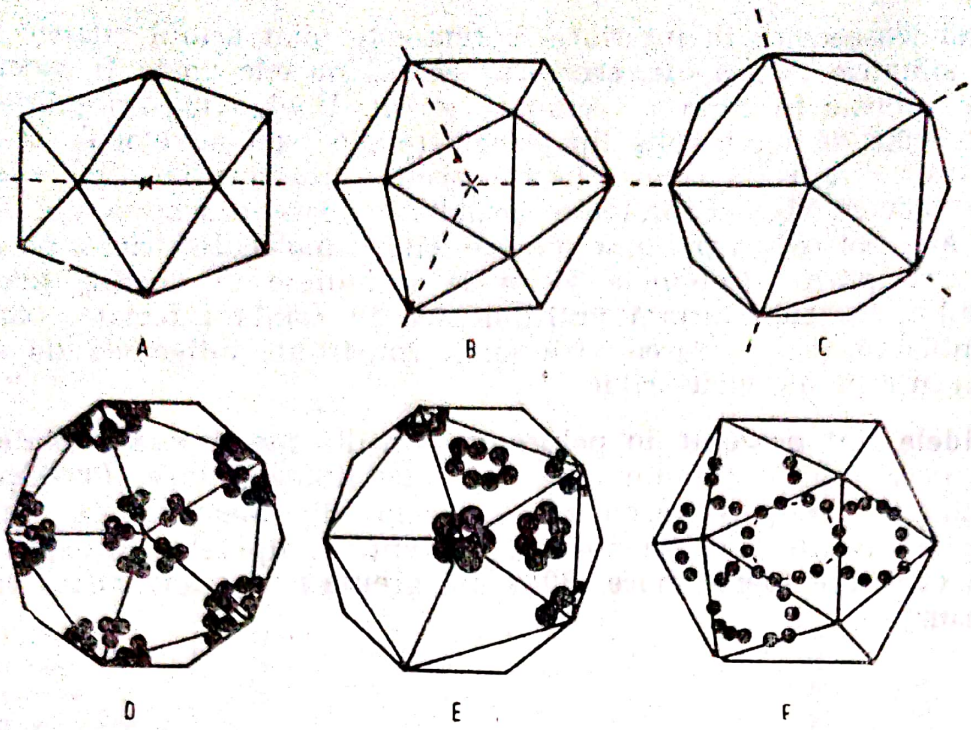


Fig. 4.2. **Proprietăți ale structurii icosaedrice.**
Icosaedru văzut după axele de simetrie de ordinul 2 (A), 3 (B) și 5 (C). Cîteva posibilități de grupare a protomerilor în capsomeri, modele probabile pentru poliovirusuri (D), parvovirusuri (E), calicivirusuri (F) (după Fenner F., D.O. White).

unui icosaedru, corp geometric regulat, alcătuit din 20 fețe triunghiulare, 30 de laturi și 12 vîrfuri (fig. 4.2).

Numărul de subunități care se repetă în capsidele icosaedrice se supune unei reguli de selecție; virionii pot fi alcătuiți din 60 protomeri sau multipli de 60. În acest caz, protomerul poate fi format din unul sau mai multe polipeptide. În practică este mai ușor să se determine numărul de capsomere, pentru că ele pot fi văzute la microscopul electronic pe preparate nepurificate.

S-a văzut că un capsomer poate fi alcătuit din 5 protomeri (dacă se află în vîrfurile icosaedrului, este un pentamer sau penton și se învecinează cu alte 5 capsomere) sau 6 protomeri (dacă se află pe laturile sau fețele icosaedrului este un hexamer sau hexon, se învecinează cu alte 6 capsomere). Există o regulă de selecție și pentru numărul posibil de capsomere într-un icosaedru. Pentru virusurile animale se cunosc exemple de la 32 capsomere (parvovirusuri) pînă la 1112 capsomere (iridovirusuri). Numărul de capsomere al unui virus este astfel un caracter constant, ceea ce a făcut ca el să fie utilizat ca un criteriu în clasificare.

4.1.3. FORMA ȘI DIMENSIUNILE VIRUSURILOR

Forma virusurilor (fig. 4.3) rezultă din arhitectura virională. Toate virusurile icosaedrale au formă apropiată de sferă; prezența peplosului accentuează și mai mult această asemănare. Virusurile cu nucleocapsidă elicoidală au forme diferite: *bastonaș* sau *filament* — VMT, bacterio-

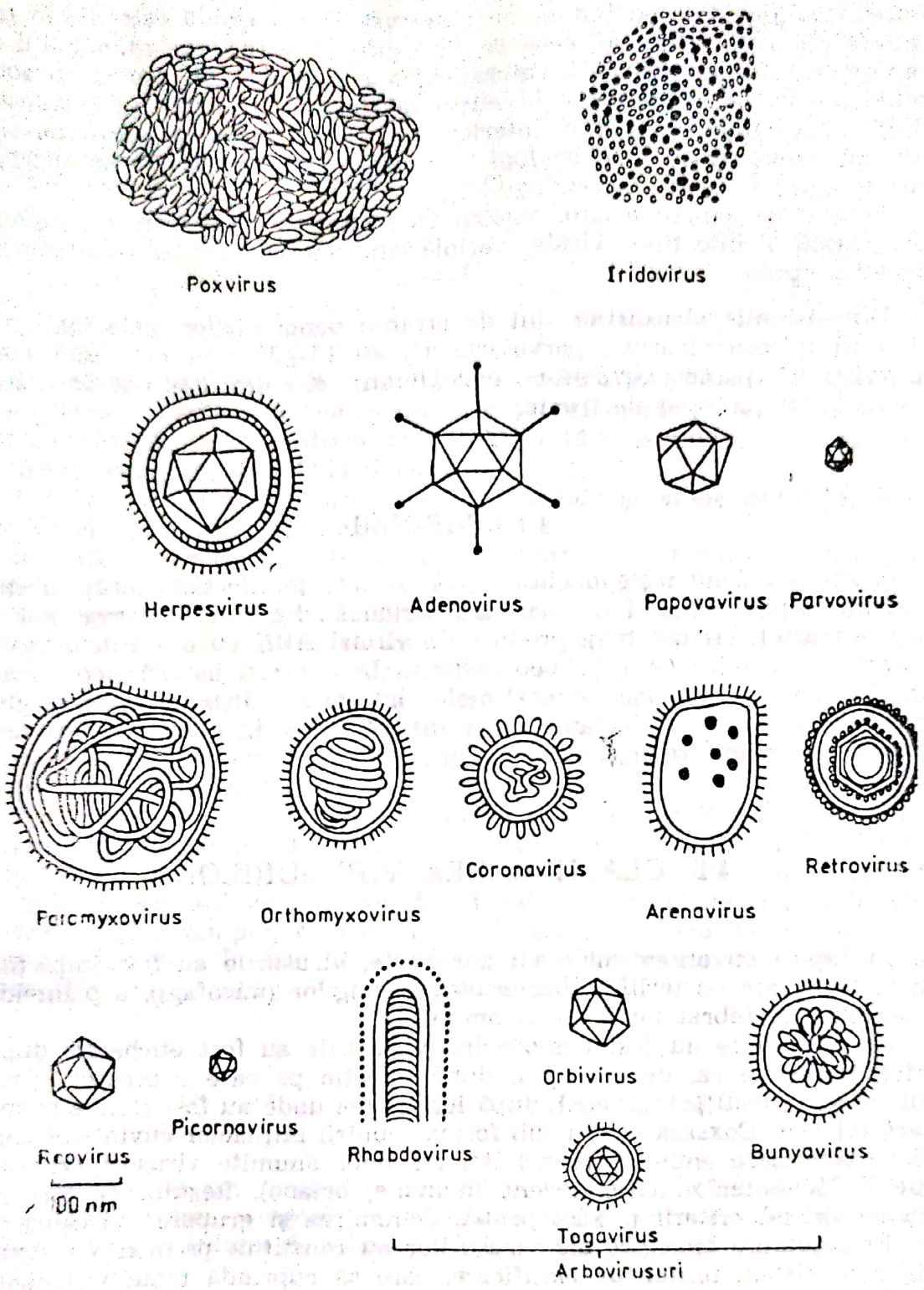


Fig. 4.3. Forma şi dimensiunile virusurilor (după Fenner F. şi D. O. White).

fagi ş.a.; *sferică* — virusurile cu ARN a căror nucleocapsidă este înghemuită şi învelită într-un peplos (orthomyxovirusuri, paramyxovirusuri, etc.).

Există particularităţi de structură şi formă, dintre care cele mai importante sînt următoarele: — *poxvirusuri* — formă generală prismatică (de cărămidă); — *adenovirusuri* — la vîrfurile icosaedrului sînt ataşate

fibre terminate într-un buton; — *reovirusuri* — capsida este dublă (alcătuită din două straturi), ceea ce face dificilă aprecierea numărului de capsomere, dar le conferă în microscopia electronică un aspect caracteristic; — *rhabdovirusuri* — învelișul dă forma de obuz, nucleocapsida fiind împachetată ordonat în interior; — *arenavirusuri* — în virion sînt prezenți ribozomi; — *bacteriofagi* — unii bacteriofagi au forma specială cu cap și coadă (vezi bacteriofagul).

Forma particulară a unor virioni dă informații utile pentru diagnosticul rapid al infecțiilor virale: variolă, sindrom diareic cu rotavirusuri, hepatite virale.

Dimensiunile virusurilor sînt de ordinul nanometrilor; cele mai mici virusuri (picornavirusuri, parvovirusuri) au 15—30 nm, cele mai mari (poxvirusuri, paramyxovirusuri) aproximativ 300 nm. Ele pot fi văzute numai la microscopul electronic.

4.1.4. VIROIZII

Termenul denumește o clasă nouă de agenți infecțioși alcătuiți numai din acid nucleic, fără structură virională. Se cunosc cîteva boli la plante (cartof, crizantemă), produse de viroizi ARN cu o greutate moleculară foarte mică (sub 100.000 daltoni). Descoperiți în 1967, constituie un domeniu nou, în care cunoștințele sînt încă la început. Este posibil ca astfel de unități infectante să se întîlnească și în etiologia unor boli cronice ale mamiferelor și chiar ale omului.

4.2. CLASIFICAREA VIRUSURILOR

În raport cu organismele vii parazitate, virusurile au fost împărțite în virusuri ale bacteriilor (bacteriofagi), fungilor (micofagi), a plantelor, insectelor, vertebratelor, inclusiv omului.

Pe măsură ce au fost descoperite, virusurile au fost etichetate după criterii diferite ca, de exemplu, după infecția pe care o produc (virusul rabic, virusul gripal etc.), după localitatea unde au fost izolate prima oară (virusul Coxsackie) sau sub forma reunirii inițialelor cuvintelor care să caracterizeze anumite proprietăți ale unor anumite virusuri (virusurile ECHO-enterice, citopatogene, humane, orfane). Rezultă de aici că nu au existat criterii precise pentru denumirea și gruparea virusurilor.

Proprietățile biologice ale virusurilor au constituit premiza construirii unui sistem unitar de clasificare, care să cuprindă toate virusurile.

Din mai multe propuneri de clasificare a virusurilor, cea cunoscută ca sistem Lwoff, Horne, Tournier rămîne la baza clasificării actuale și de perspectivă a virusurilor.

Criteriile principale stabilite au la bază proprietățile definitorii ale virusurilor și, în primul rînd, ale virionului pe baza cărora se realizează o dicotomizare repetată a virusurilor, după cum urmează:

1. pe baza tipului de acid nucleic virusurile se împart în *virusurile cu ADN (dezoxivirusuri)* și *virusuri cu ARN (ribovirusuri);*

Scanned with OKEN Scanner

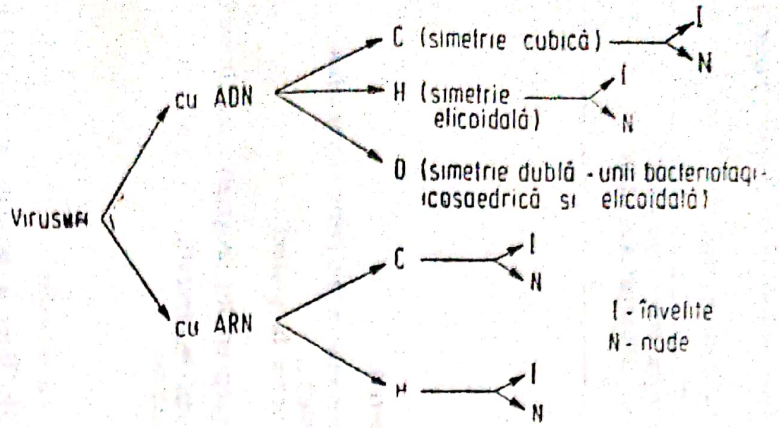


Fig. 4.4. Clasificarea virusurilor în raport de proprietăţile virionului.

2. fiecare din acestea la rîndul lor se împart în *virusuri cu simetrie icosaedrică (cubică)* şi *elicoidală*. Se adaugă unii bacteriofagi cu ADN cu *simetrie dublă* — icosaedrică şi elicoidală (de exemplu, bacteriofagii cu cap şi coadă din seria T la *E. coli);*

3. unele virusuri sînt *învelite (cu anvelopă)* şi altele *nude* (nucleocapsidale), rezultînd ordonarea din figura 4.4.

În cadrul acestor taxe principale se conturează *familii* de virusuri, la cele cu simetrie cubică în dependenţă de numărul de capsomere, iar la cele elicoidale în raport cu diametrul virionului sau al helixului nucleoproteic. Pentru conturarea familiei şi a genurilor se adaugă şi alte criterii: inactivarea termică, sensibilitatea sau rezistenţa la solvenţi organici şi detergenţi, sistemele de cultivare şi efectele citopatogene, mecanismul replicării, proprietăţile acidului nucleic etc. Proprietăţile antigenice ale virionului sînt utile atît pentru definirea familiei, genului şi speciei, cît mai ales a tipurilor antigenice.

Se acceptă azi ca familiile şi genurile să fie denumite cu nume latinizate, pentru familie adăugîndu-se la denumirea proprie cea de *viridae* (Reoviridae), iar pentru gen cea de *virus* (Reovirus). Fără îndoială, că cel puţin o perioadă de timp vor fi utilizate şi denumirile convenţionale anterioare (de exemplu, Myxovirusuri şi virusuri gripale pentru familia Myxoviridae etc.). În tabelul 4.2 sînt prezentate principalele familii de virusuri cu importanţă pentru virusologia medicală.

4.3. CULTIVAREA VIRUSURILOR

Virusurile se pot multiplica numai în celule vii. Cultivarea lor se poate face pe trei categorii de sisteme celulare: *animale de laborator, ou embrionat* şi *culturi de celule.*

4.3.1. CULTIVAREA LA ANIMALE DE LABORATOR

Tehnicile de transmitere a îmbolnăvirilor umane la animale de laborator, prin filtrate din produsele patologice, au constituit primele metode de cultivare a virusurilor. S-a reuşit astfel izolarea multor virusuri umane, de exemplu, v. poliomielitei la maimuţă, v. gripal la dihor.

Scanned with OKEN Scanner

Clasificarea virusurilor

Familia	Proprietăţi	Reprezentanţi	Manifestări clinice
		VIRUSURI CU ADN	
a) *Simetrie cubică neînvelite*			
Parvoviridae	ADN monocatenar, virion de 20 nm, 32 capsomere.	Virusul latent al şobolanului V. adenosatelite (defective) Agentul din Norwalk	 Enterită
Papovaviridae	ADN dublu catenar, virion de 40—55 nm, 72 capsomere	V. *pap*iloamelor V. *po*lioamelor V. *va*cuolizant SV 40 V. JC şi BK	Papiloame la om (virusul verucilor umane) Polioame la şoareci Leucoencefalita progresivă multifocală
Adenoviridae	ADN dublu catenar, virion de 70—90 nm, 252 capsomere.	Mastadenovirus: virusuri de la mamifere; 34 tipuri umane Aviadenovirus: la păsări	Infecţii respiratorii, conjunctivale.
b) *Simetrie cubică învelite*			
Herpetoviridae	ADN dublu catenar, virion de 150 nm, 162 capsomere.	Herpes simplex 2 tipuri V. varicelae — zona zoster V. citomegaliae V. Epstein—Barr	Variate infecţii primare şi reinfecţii, herpes. Varicela la primoinfecţie, zona-zoster în reinfecţie Sindrom congenital Mononucleoza infecţioasă
c) *Simetrie elicoidală complexă*			
Poxviridae	ADN dublu catenar, virion prismatic (150/200—300 nm)	Orthopoxvirus: V. variolei V. vaccinal Parapoxvirus (Orf şi irusul nodulilor lăptarilor)	 Variola Pentru vaccinare antivariolică Dermatita pustuloasă

Scanned with OKEN Scanner

VIRUSURI CU ARN

(continuare) Tabel 4.2.

a) *Simetrie cubică neînvelite*			
Picornaviridae pico = mic, rna = acid ribonucleic	ARN monocatenar, virion de 25—30 nm, 32 capsomere	Enterovirus: V. poliomielitei 3 tipuri V. Coxsackie A 24 tipuri B 6 tipuri V. echo (*e*nteric, *c*itopatogen, *h*uman, *o*rfan) 33 tipuri Enterovirus 68—71 Rhinovirus : peste 100 tipuri	Poliomielită Herpangină Pleurodinie epidemică Meningite Guturai
Reoviridae respirator, enteric, orfane	ARN dublu catenar, format din 10 segmente, virion de 60—80 nm, capsidă dublă, 32—92 capsomere	Reovirus : 3 tipuri Orbivirus Rotavirus	Infecţii respiratorii minore Arboviroze Enterită la copil
b) *Simetrie cubică învelite*			
Togaviridae	ARN monocatenar, virion de 40—70 nm.	Alfavirus Flavivirus Rubivirus (v. rubeolei)	Arboviroze Arboviroze Rubeolă
c) *Simetrie elicoidală neînvelite*			
Virusuri ale plantelor, (de exemplu v. mozaicului tutunului)			
d) *Simetrie elicoidală învelite*			
Orthomyxoviridae	ARN monocatenar, din 8 segmente, virion de 100 nm, diametrul helixului 9 nm, mixofilie	Myxovirus influenzae (virusurile gripale tip A, B, C)	Gripă
Paramyxoviridae	ARN monocatenar, virion de 150—250 nm, diametrul helixului 18 nm, mixofilie.	Paramyxovirus: P. parainfluenzae 4 tipuri P. parotitidis (v. urlian) Morbillivirus (v. rujeolei) Pneumovirus (v. respirator sinciţial)	Infecţii respiratorii Parotidita epidemică(oreion) Rujeolă, PESS Infecţie respiratorie

Scanned with OKEN Scanner

(continuare) *Tabel 4.2*

Familia	Proprietăţi	Reprezentanţi	Manifestări clinice
Rhabdoviridae	ARN monocatenar, virion în formă de glonţ 80 × 180 nm.	V. rabiei	Rabia
Coronaviridae	ARN monocatenar, virion de 80—130 nm, diametrul helixului 7—9 nm.	trei serotipuri umane	Infecţii respiratorii
Arenaviridae arenosus=nisipos	ARN monocatenar, virion de 80—120 nm cu particule electronodense	V. choriomeningitei limfocitare	
		V. Lassa	Febră hemoragică
		V. Junin	Febră hemoragică
		V. nefropatiei hemoragice	Nefropatie hemoragică
Bunyaviridae	ARN monocatenar, virion de 90—100 nm.	V. din grupul California	Encefalită
		V. din grupul febrelor de flebotomi	Febra papataci
		V. febrei hemoragice de Crimeea—Congo	Febră hemoragică
Retroviridae	ARN monocatenar, virion de 90—120 nm cu transcriptază inversă, structură complexă.	Oncornavirinae	Tumori la animale
		Spumavirinae	Prezente la unele specii animale
		Lentivirinae	Bolile Visna şi Maedi la oaie
	VIRUSURI NECLASIFICATE		
Virusurile hepatitelor	ARN monocatenar, virion de 27 nm	V. hepatitei A (probabil la Picornaviridae)	Hepatita A (epidemică)
	ADN dublu catenar, virion de 45 nm învelit.	V. hepatitei B	Hepatita B (serică)

Scanned with OKEN Scanner

În această perioadă, în care tehnicile viruosologice erau o ramură a histopatologiei, s-au descris leziunile care apar la om sau animal, incluziile virale, s-a cristalizat noţiunea de tropism al virusurilor.

Experimentarea pe animale de laborator este însă grevată de o serie de neajunsuri ca: specificitatea de gazdă a unor virusuri (nu pot fi trecute la animale), infecţii virale latente ale animalelor reactivate în cursul experienţelor etc. De aceea, de cîte ori este posibil, aceste tehnici sînt înlocuite cu altele mai economice, mai rapide, cu rezultate constante şi reproductibile, experimentarea pe animale constituind fie modele de cercetare, fie de control al vaccinurilor.

Animalul de laborator utilizat în mod curent este şoarecele nounăscut, pentru virusuri (Coxsackie A, unele arbovirusuri) care nu se pot izola în alte sisteme celulare.

4.3.2. CULTIVAREA ÎN OUL EMBRIONAT

Cultivarea virusurilor în oul embrionat de găină, iniţiată de W o o d r u f f, G o o d p a s t u r e şi B u r n e t, a constituit un progres remarcabil în virusologie, prin utilizarea unui sistem de celule constituit din ţesuturi în dezvoltare, cu multiplicare activă, practic steril, lipsit de mijloacele de apărare antiinfecţioasă existente la animalele adulte. Cultivarea se face prin inoculare în anexele embrionare: în cavitatea amniotică şi alantoidiană, sacul vitelin (de gălbenuş), pe membrana coriolantoidiană (fig. 4.5). Ţinînd cont de anexa embrionară în care virusul se dezvoltă cel mai bine şi este mai uşor de pus în evidenţă, de dinamica dezvoltării anexelor embrionare şi de timpul necesar multiplicării virale, s-a ajuns la stabilirea căilor şi a perioadelor optime de inoculare pentru diverse virusuri (tabel 4.3).

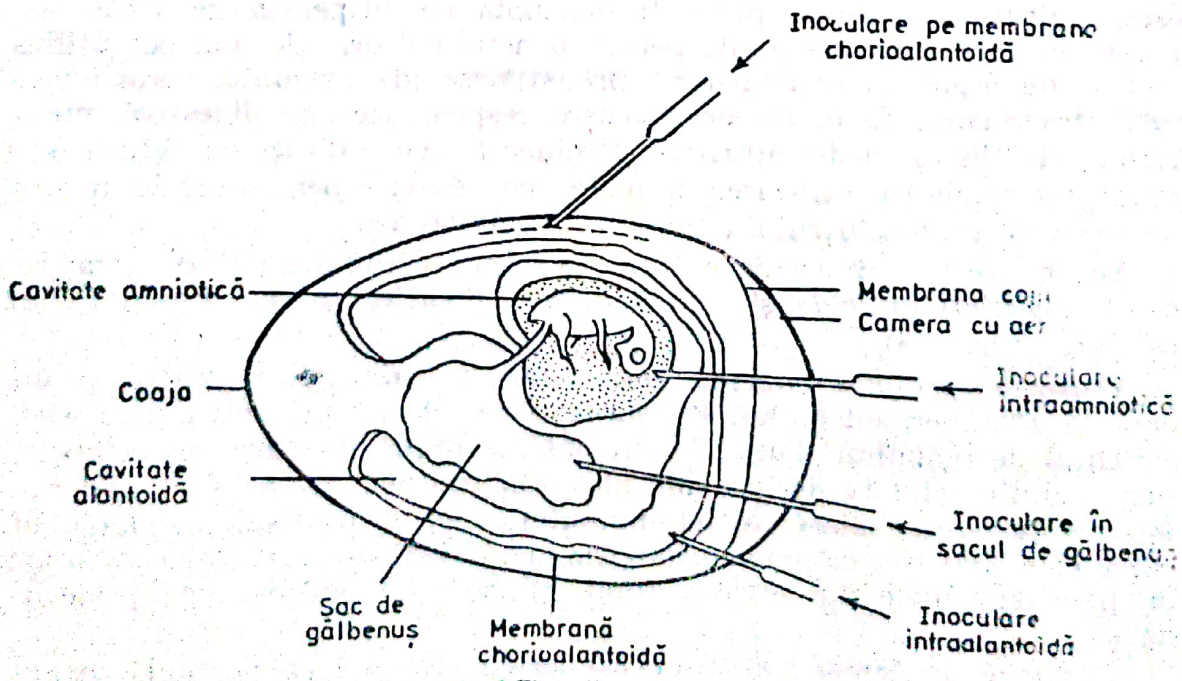


Fig. 4.5. Căi de inoculare în oul embrionat.

Tabel 4.3

Cultivarea virusurilor în ou embrionat

Vîrsta embrionului (zile)	Anexă embrionară	Virusuri	Efect
3—8	Sac de gălbenuș	Herpes simplex Arbovirusuri	Moartea embrionului Hemaglutinare
10—12	Chorio-alantoidă	Herpes simplex Poxvirusuri Sarcom Rous	Leziuni focale
7—12	Amnios Alantoidă	V. gripale V. parotiditei epidemice	Hemaglutinare Moartea embrionului

4.3.3. CULTIVAREA VIRUSURILOR ÎN CULTURI DE CELULE

După ce Carrel a demonstrat că celulele mamiferelor pot fi cultivate *in vitro* timp nelimitat, s-a obținut multiplicarea unor virusuri în afara organismului animal (Levaditi, Landsteiner v. poliomielitei), iar metoda a devenit obișnuită după ce Enders Weller și Robbins (1949) au demonstrat cultivabilitatea virusului poliomielitic în celule neneuronale. Dintre multiplele posibilități de cultivare *in vitro* a celulelor, în diagnosticul de laborator se utilizează culturile în strat monocelular. Țesuturile fragmentate în piese mici sînt disociate cu tripsină în celule individuale, diluate într-un mediu nutritiv și introduse în recipiente de sticlă sau plastic, unde se atașează și se multiplică pe suprafață. Cultura confluentă poate fi inoculată cu suspensia de virus sau poate servi ca sursă de celule pentru o nouă cultură. Se mai pot utiliza culturi de organ pentru virusuri pretențioase (de exemplu, coronavirusuri), fragmente, de obicei de mucoasă respiratorie sau digestivă, menținute viabile în medii nutritive. Obținerea unei culturi de celule cere condiții speciale ca: utilizarea de materiale netoxice pentru celule, menținerea în tot timpul lucrului a viabilității celulare ș.a.

Se cunosc trei tipuri de culturi de celule, denumite *culturi primare*, *celule (tulpini) diploide* și *linii celulare (stabilizate)* sau pe scurt *linii celulare* (tabel 4.4).

Culturile primare cuprind celule care se multiplică pentru prima oară în afara organismului. Ca sursă de celule se utilizează, mai ales, rinichiul de maimuță. Tulpinile diploide se obțin din țesuturile embrionare. Liniile celulare derivă, mai ales, din țesuturi tumorale și, mai rar, din țesuturi embrionare: astfel linia HeLa derivă dintr-un carcinom de col uterin, KB din carcinom rinofaringian, BHK din rinichi de embrion de hamster, unele din acestea fiind cultivate în eprubetă de peste 30 de ani.

Culturile de celule constituie azi gazda cea mai convenabilă pentru izolarea majorității virusurilor umane. Multe dintre ele au fost desco-

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.4

Tipuri de culturi de celule

Proprietăţi	Culturi primare	Celule (tulpini) diploide	Linii celulare (stabilizate)
Cariotip	diploid	diploid	heterodiploid
Nr. de pasaje	cîteva	aproximativ 50	nelimitat
Dependenţă de ancorare (pe suprafaţă solidă)	da	da	nu (pot fi cultivate în suspensie)
Necesitate de ser în mediu	5—10%	5—10%	2—5%
Susceptibilitate la infecţia virală	largă	largă	restrînsă
Origine tisulară	ţesut normal adult sau embrionar	ţesut normal embrionar	ţesut canceros sau ţesut normal embrionar
Tipuri morfologice	amestec al celor două tipuri	fibroblastic	epitelial sau fibroblastic

perite sau au putut fi izolate numai pe culturi de celule: adenovirusuri, v. varicelei — zona zoster şi v. citomegaliei cu incluzii, v. paragripale, rhinovirusurile, v. Echo ş.a.

4.3.4. CONSECINŢE ALE MULTIPLICĂRII VIRALE

Principalele modalităţi de detectare a multiplicării virusurilor la gazdele utilizate în mod curent sînt prezentate în tabelul 4.5. Ca regulă generală, modificările apărute la gazdele inoculate dau indicaţii asupra grupului de virusuri căruia îi aparţine virusul inoculat, identificarea speciei sau a tipului făcîndu-se prin reacţii antigen-anticorp.

Tabel 4.5

Detectarea multiplicării virale

Gazdă	Consecinţa multiplicării	Identificare
Şoarece sau alt animal	— paralizie, moarte — alte fenomene clinice	— histopatologie; — r. Ag—Ac.: seroneutralizare; imunofluorescenţă.
Ou embrionat	— fără modificări macroscopice — prezenţă de agent hemaglutinant — hemoragii, moartea embrionului — leziuni productive pe membrană	— r. Ag—Ac: hemaglutinoinhibare, fixare de complement — r. seroneutralizare — histopatologie — r. Ag—Ac; imunofluorescenţă
Culturi de celule	— efect citopat — hemadsorbţie — interferenţă	— r. Ag—Ac; seroneutralizare, inhibiţia hemadsorbţiei, hemaglutinoinhibare; fixare de complement; imunofluorescenţă

Scanned with OKEN Scanner

O consecință a multiplicării virusurilor, care ocupă un loc aparte prin generalitatea sa, o constituie apariția în celulele infectate a *incluziilor virale:* formațiuni intracelulare cu o colorabilitate modificată, dezvoltate progresiv în timpul multiplicării, reprezentînd, în general, locul în care se sintetizează componente virale sau se asamblează virioni. Sînt unice sau multiple, mari sau mici, rotunde sau de formă neregulată, acidofile sau bazofile, intranucleare sau intracitoplasmatice (tabel 4.6).

Tabel 4.6

Incluzii virale

Localizare	Colorabilitate	Virus
Nuclear	Bazofilă Acidofilă	Adenovirusuri Herpetoviridae Papovaviridae
Citoplasmatic	Acidofilă	Paramyxoviridae Reoviridae Rhabdoviridae (corpi Babeș-Negri) Poxviridae (corpi Guarnieri)
Nuclear și citoplasmatic	Acidofilă	V. rujeolei Citomegalovirus

Efect citopat (ECP). Multiplicarea virusurilor în culturi de celule poate duce la degenerare și distrugere celulară, fenomen care poartă numele de efect citopat. Aceste virusuri sînt citopatogene. Alteori celulele infectate continuă să se multiplice, deși produc virioni. Astfel de celule exprimă la suprafață antigene noi, determinate viral. În sfîrșit, în alte cazuri, prezența în celulă a genomului viral determină transformarea tumorală a celulelor, care, chiar în absența producerii de virioni, este și ea însoțită de apariția unor antigene noi. Diversele alterări care duc la distrugerea celulelor infectate cu virusuri se manifestă ca rotunjire sau retracție celulară, dezintegrări ale organitelor celulare, apariția de vacuole sau granule în citoplasmă, picnoză nucleară, dezvoltare de incluzii, fuziunea citoplasmelor cu formarea de sinciții. Acestea pot fi examinate la microscop pe celule vii necolorate, obținînd informații generale asupra modificărilor grosiere a stratului celular și, mai ales, a distribuției acestora în pînză de celule: *ECP difuz,* celule afectate răspîndite pe toată cultura sau *ECP în focar;* între aglomerările de celule alterate rămîn multă vreme zone de celule normale. Preparatele colorate dau informații de detaliu: incluzii, acumulări anormale de acizi nucleici, dispoziția cromatinei. Se utilizează fie colorații obișnuite ca Giemsa sau hematoxilină-eozină, fie colorații speciale pentru acizi nucleici sau Feulgen sau colorația cu acridin orange (tabel 4.7). Unele viru-

Tabel 4.7

ECP al principalelor virusuri umane

Efect citopat	Virusuri
Picnoză, distrugere celulară (efect citocid) Agregare celulară Sinciții Minim	Entero-, pox-, reo-, toga-, rhinovirusuri. Adeno-, herpeto virusuri Paramyxo-, herpetovirusuri Orthomyxo-, corona-, retro-, arenavirusuri, v. rabic.

Scanned with OKEN Scanner

suri produc ECP minim, adeseori greu de deosebit de alterările care apar în culturile celulare vechi (de 10—20 zile). Altele se multiplică fără a produce ECP. În aceste cazuri este posibil să se detecteze prezența virusului prin *hemadsorbție, interferență, imunofluorescență.*

Hemadsorbția. Unele virusuri (v. gripale, paragripale) au la suprafața virionului proteine prin care aderă la suprafața hematiilor de diverse origini -hemaglutinine. Prezența hemaglutininelor în membranele celulelor infectate le conferă acestora proprietatea de a adsorbi pe suprafață hematiile corespunzătoare. Reacția se poate repeta de mai multe ori cu aceeași cultură și poate servi la identificare prin inhibiția hemadsorbției cu seruri antivirale.

Interferență. Unele virusuri (v. rubeolei) fără a produce ECP determină un fenomen de interferență. Cultura inoculată pentru izolarea v. rubeolei este testată cîtva timp mai tîrziu prin infectare cu un v. citopatogen. Lipsa multiplicării acestuia pledează cu mare probabilitate pentru prezența în cultură a v. rubeolos.

Hemaglutinare. Multe virusuri pot aglutina hematii de diverse origini (tabel 4.8). Evidențierea unui agent hemaglutinant în lichidele din sistemele de celule infectate și inhibarea hemaglutinării cu seruri standard duc de multe ori la identificarea tipului sau subtipului de virus izolat.

Tabel 4.8

Hemaglutinarea virală

Virus		Hematii și condiții de reacție
Familie	Gen/specie	
Parvoviridae	Adeno-asociat tip 4	Om, cobai; 4 °C
Papovaviridae	Polyoma	Cobai; 4 °C
Adenoviridae	Majoritaea tipurilor	Maimuță, șobolan; 37 °C
Poxviridae	Variolă, vaccină	Pasăre (unele); 37 °C
Picornaviridae	Coxsackie (unele tipuri)	Om
	Echo (unele tipuri)	Om
	Rhinovirus (unele tipuri)	Oaie; 4 °C
Togaviridae		Gîscă, porumbel; *p*H și temperatură critică
Orthomyxoviridae	Gripale A, B	Pasăre, om, cobai
Paramyxoviridae	Paragripale, urlian	Pasăre, om, cobai
	Rujeolă	Maimuță; 37 °C
Rhabdoviridae	Rabic	Gîscă; 4 °C
Coronaviridae	Tulpini umane	Șobolan, șoarece, pasăre
Bunyaviridae		
Reoviridae	Reovirus	Gîscă; *p*H critic; om

4.4. MULTIPLICAREA VIRUSURILOR

4.4.1. GENERALITĂȚI

Avînd proprietatea de a parazita celula vie, virusurile au un mod particular de multiplicare care se caracterizează prin faptul că ele nu cresc și nu se divid. De aceea este mai corect să se vorbească despre

replicarea virusurilor. Virusurile pătrund în celulele susceptibile în care se eliberează acidul lor nucleic, care în poziţii adecvate şi diferite din celulă se replică de mai multe ori şi specifică sinteza proteinelor de structură şi a celor necesare replicării. Componentele virale sînt apoi asamblate în unităţile mature, infecţioase — virionii — care sînt eliberaţi din celula infectată. Rezultă de aici că în realitate activitatea virusurilor reprezintă o consecinţă a multiplicării lor, care la rîndul ei constituie o modalitate de manifestare a *sistemului ecologic* virus-celulă susceptibilă. Acest sistem ecologic este însă extrem de variat, virusurile ajungînd să posede, pentru a realiza ciclul de multiplicare, strategii variate, în raport de informaţia lor genetică şi de condiţiile oferite de celula gazdă. În această varietate strategică un rol important îl au: tipul de acid nucleic (ADN sau ARN, mono-sau bicatenar); sediul general al multiplicării; modalitatea de eliberare din celulă ş.a Capacitatea tuturor virusurilor de a realiza în celula infectată un ARN-m este o trăsătură generală. ARN-m viral se constituie în modalităţi variate: a. genomul viral funcţionează ca ARN-m; b. aparatul celular este folosit în scopul transcrierii acidului nucleic viral în ARN-m; c. virionul posedă în structura sa sistemele enzimatice necesare sintezei ARN-m. Multiplicarea virală se desfăşoară în mai multe faze (fig. 4.6).

Ataşarea. Într-un prim stadiu virionii întîlnesc întîmplător celulele susceptibile de care se ataşează, independent de temperatură, prin forţe electrostatice. Într-un al doilea stadiu are loc o fixare fermă pe membrana citoplasmatică, pe receptori virali specifici, care reprezintă grupări complementare faţă de poziţiile de ataşare de pe suprafaţa virionilor. Pentru virusul gripal, de exemplu, receptorii sînt glicoproteici, iar tratarea cu neuraminidază îndepărtează componenta de ac. neuraminic din aceştia şi în consecinţă virionii nu se mai pot ataşa de celulele astfel tratate.

Penetrarea şi eliberarea acidului nucleic. Cele două faze pot să se desfăşoare separat în timp şi ca poziţie celulară sau de multe ori să constituie o fază comună. Intervin următoarele mecanisme principale: unele virusuri pătrund în celulă printr-un *proces de endocitoză denumit viropexie* într-o veziculă fagocitară, în care are loc, sub acţiunea enzimelor lizozomale, degradarea capsidei şi eliberarea acidului nucleic viral. La poxvirusuri eliberarea completă a acidului nucleic se face după pătrunderea în celulă a nucleocapsidei, sub acţiunea unei enzime de „dezbrăcare", de informaţie virală. La cele mai multe virusuri învelite, penetrarea se face prin fuziunea învelişurilor virale cu membrana celulară (similaritate de structură), ajungînd ca nucleocapside în citoplasmă unde are loc decapsidarea. O altă modalitate de penetrare o reprezintă interacţiunea virionului cu receptorii de pe suprafaţa celulară, iar prin acţiunea enzimelor celulei gazdă este iniţiată decapsidarea la acest nivel,

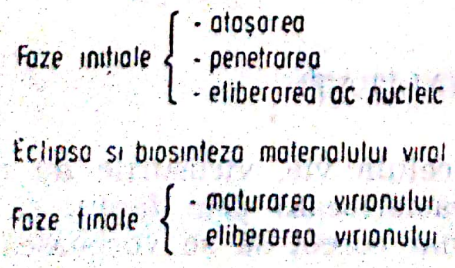


Fig. 4.6. Fazele multiplicării virale.

acidul nucleic liber pătrunzînd direct în citoplasmă. Materialul capsidal rămîne fixat pe suprafaţa celulei, putînd împiedeca ataşarea de virusuri adiţionale. La toate virusurile (cu excepţia reoviridelor) penetrarea şi dezbrăcarea virionului duc la eliberarea acidului nucleic. Fazele iniţiale de la ataşare la eliberarea acidului nucleic durează variabil în raport de virus de la cîteva minute, pînă la aproape două ore.

Eclipsa şi biosinteza materialului viral. După fazele anterioare, o dată cu eliberarea acidului nucleic viral, în celulă nu se mai poate evidenţia unitatea virală — virionul — cu toate proprietăţile ei morfo-structurale, antigenice, şi, mai ales, infectante, fapt ce a determinat etichetarea acestei faze cu termenul de eclipsă.

De fapt însă, în această perioadă au loc cele mai importante procese biochimice, care duc la *replicarea acidului nucleic* şi sinteza componentelor de structură ale virionului. În general, evenimentele biochimice pot fi schematic prezentate ca desfăşurîndu-se la multe virusuri într-o *perioadă precoce, timpurie,* în care sînt activate reacţiile care pregătesc iniţierea replicării genomului viral şi controlul metabolismului celular în această direcţie şi o *perioadă tardivă,* în care se exprimă alte funcţii ale informaţiei virale şi, în prim plan, sinteza componentelor virale. Aceasta implică o transcriere secventată în timp a genomului viral, prin modalităţi de control multiple. Faza durează pînă la apariţia în lichidul celular a primilor virioni.

Fazele finale sînt constituite din maturarea şi eliberarea din celulă a virionilor. După ce au fost sintetizate componentele virale, are loc asamblarea din acestea a virionilor, proces denumit şi *morfogeneză.* Pentru virusurile nucleocapsidale nude, procesul se realizează spontan, structura proteinelor capsomerice fiind cea care dictează constituirea capsidei în care este inclus acidul nucleic. La unele virusuri, în această etapă intervin proteine ce participă la morfogeneză (proteine de asamblare). Pentru virusurile învelite, după constituirea nucleocapsidei, la trecerea prin membrană, în care s-au acumulat elemente virale de înveliş (de exemplu, hemaglutinină şi neuraminidază), se adaugă anvelopa constituită din componente din membrana celulară şi cele specific virale.

Eliberarea virusurilor citocide se realizează în urma lizei celulei. Virusurile învelite părăsesc celula printr-un proces de înmugurire: virionul este împins într-o proeminenţă de membrană prin care se eliberează în mediu. Unele relaţii între învelirea virusurilor cu anvelopă şi eliberare se pot vedea în figurile 4.7 şi 4.8.

4.4.2. PARTICULARITĂŢI ALE MULTIPLICĂRII VIRUSURILOR CU ADN

Principalele familii cu ADN dublu catenar se multiplică în nucleu: *popovaviridae, adenoviridae, herpetoviridae.* cARN-ul viral se sintetizează după pătrunderea ADN-ului în nucleul celulei folosind ARN-polimeraza celulară în două etape: un ARN-m timpuriu şi un ARN-m tardiv. Cele două tipuri de ARN-m ajung în citoplasmă şi, folosind aparatul celular de sinteză proteică, duc la traducerea mesajului în proteine virale. În programul timpuriu sînt sintetizate proteine care pregătesc

Scanned with OKEN Scanner

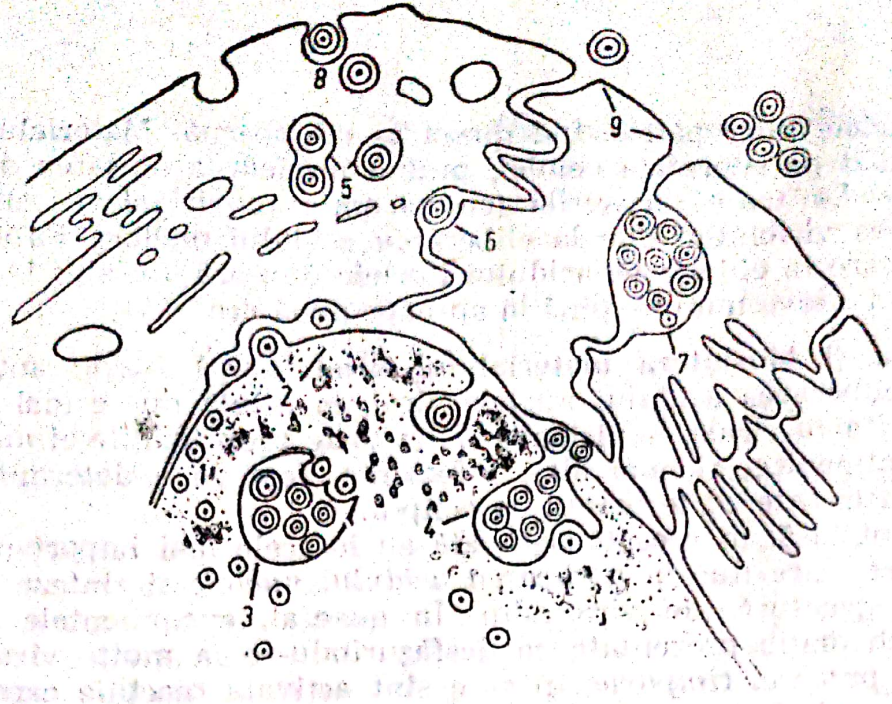


Fig. 4.7. Învelirea şi eliberarea virusului herpetic din celule.

Nucleocapsidele sînt asamblate în nucleu şi primesc învelişurile din membrana nucleară: 1 — la locul de contact membrana devine mai groasă şi înveleşte progresiv nucleocapsida; 2 — lăsînd membrana intactă, eliberează virionul în cisterna perinucleară; 3 — virusul poate fi învelit şi prin înmugurire în vacuole nucleare; 4, 5, 9 — secvenţa prin care virionul este eliberat din celulă. Lamela externă a membranei nucleare separă virionul de citoplasmă şi este eliberat prin membrană (8). O cale alternativă este reprezentată de cisternele reticulului endoplasmatic, pînă la exteriorul celulei (6, 7, 9) (după Jawetz, Melnick şi Adelberg).

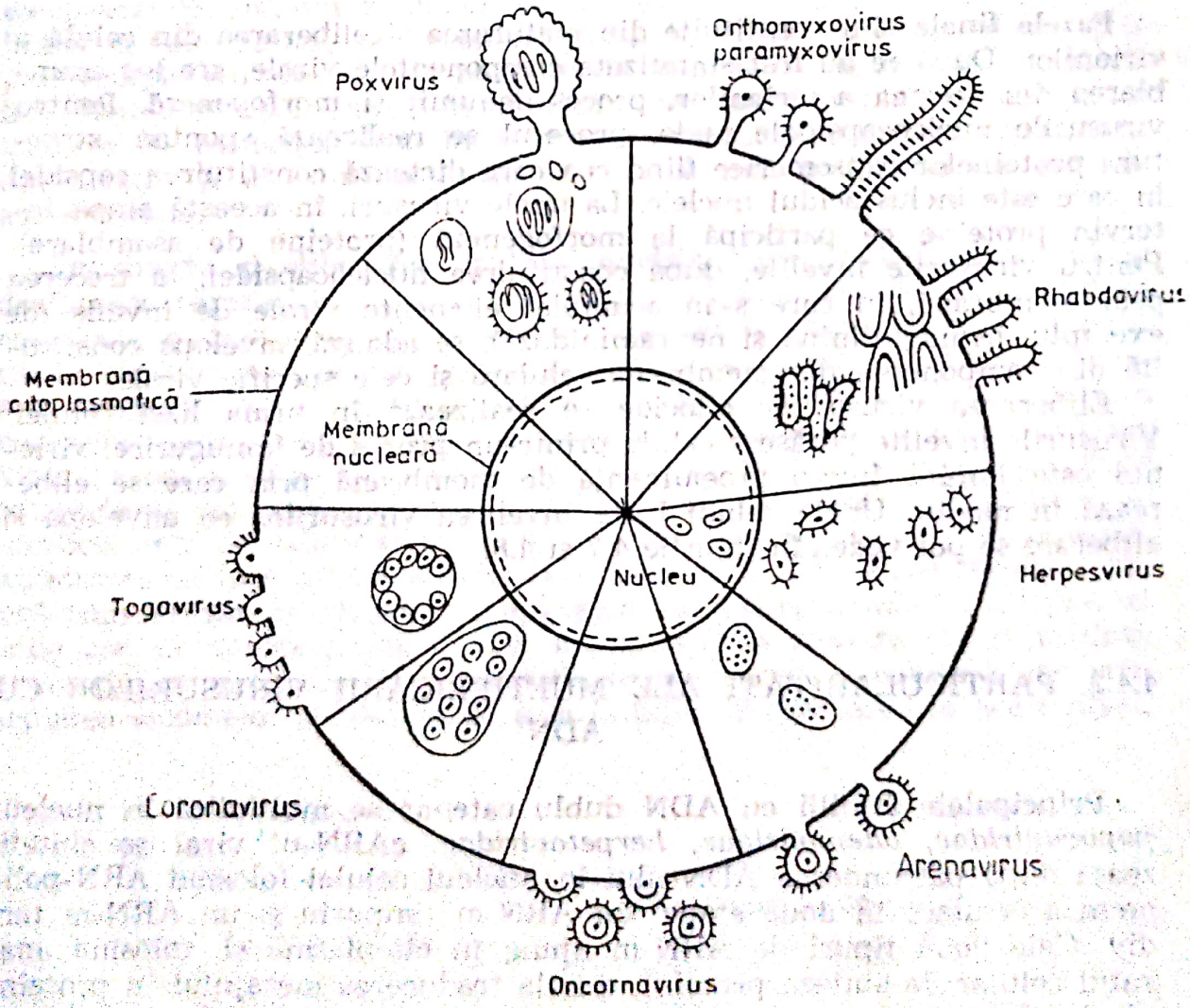


Fig. 4.8. Schematizarea relaţiilor dintre virusurile învelite şi membrana celulară (după E. Jawetz, J. L. Melnick, E. A. Adelberg).

Scanned with OKEN Scanner

replicarea ADN (timidin-kinaza, ADN-polimeraza etc.) şi proteine de control. În programul tardiv sînt sintetizate proteinele de structură şi cele cu rol în asamblarea virionului. În desfăşurarea acestor evenimente apar mecanisme de control ale transcrierii informaţiei în ARN-m timpuriu şi tardiv, precum şi un control al metabolismului celular. În consecinţă la adeno şi herpetoviridae este blocată sinteza ARN-m şi a proteinelor celulare (efect citocid) şi este indusă gena de sinteză a interferonului. La papovaviridae metabolismul celular nu este inhibat.

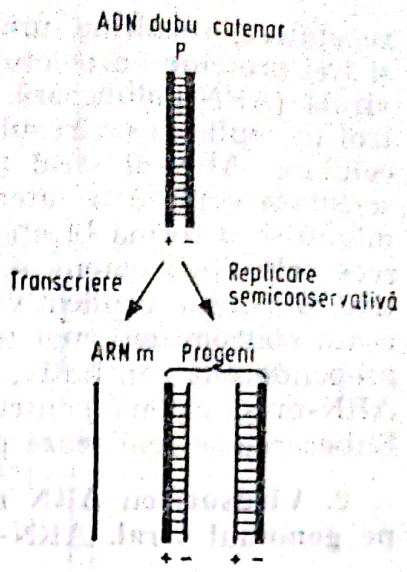


Fig. 4.9. **Replicarea virusurilor cu ADN.**

ADN-ul parental este reprezentat cu linii groase, iar cel nou sintetizat cu linii subţiri.

ADN viral serveşte ca matriţă pentru replicarea semiconservativă în nucleu (fig. 4.9) unde are loc şi asamblarea virionilor. Pentru aceasta proteinele sintetizate în citoplasmă sînt transportate în nucleu. Se produce o acumulare în exces de material viral, din care numai o parte se asamblează în timpul morfogenezei. De aceea se formează incluzii nucleare caracteristice. La herpetoviridae, la trecerea prin membrana nucleară se ataşează anvelopa (v. fig. 4.7). Virionii se elimină prin liză celulară sau alte mecanisme.

Poxvirusurile se multiplică în citoplasmă, în zone circumscrise, numite *uzine de virus* sau *viroplasme*. Pentru transcrierea informaţiei genetice în ARN-m este folosită polimeraza care intră în structura virionului. Din proteinele sintetizate, alături de cele de structură virională, fac parte şi proteinele cu rol în morfogeneză şi în controlul metabolismului celular, care este rapid şi puternic inhibat. Replicarea ADN-ul viral se face în citoplasmă prin intervenţia unei polimeraze sintetizată prin informaţie virală. În morfogeneză numai o parte din materialul viral este asamblat în virioni, restul participă la formarea incluziilor citoplasmatice. Eliberarea se face prin liză celulară.

4.4.3. PARTICULARITĂŢI ALE MULTIPLICĂRII VIRUSURILOR CU ARN

Virusurile cu ARN au o poziţie particulară deoarece ARN reprezintă depozitarea informaţiei genetice, deci va funcţiona ca matriţă pentru propria replicare, precum şi ca matriţă pentru sinteza ARN-m. Vor fi selecţionate de aceea virusuri care conturează *tipuri particulare* de multiplicare.

1. **Virusuri cu ARN monocatenar, la care genomul viral funcţionează ca ARN mesager.** La picornavirusuri şi togavirusuri ARN viral pătruns în celulă se comportă ca un ARN-m (catenă cu sens) şi totodată serveşte ca matriţă pentru a produce molecule progene de ARN.

ARN-m (genomul viral) al virusului polio reuneşte ribozomii celulari, pentru a forma un poliribozom pe care se sintetizează o proteină mare de 250 000 daltoni. Aceasta va fi supusă unor clivări enzimatice

Scanned with OKEN Scanner

repetative, rezultînd următoarele proteine: patru proteine de structură și trei proteine nestructurale. Din cele din urmă, una reprezintă replicaza virală (ARN-polimerază, ARN-dependentă), iar celelalte au rol de control în replicarea virusului (factor sigma) și în stoparea sintezei proteice celulare. ARN-ul viral (sens pozitiv) servește ca matriță pe care transcriptaza copiază o catenă complementară -ARNc, de sens negativ, formîndu-se o formă bicatenară (formă replicativă), cu viață efemeră, deoarece cele două catene se despart. Ulterior se formează pe catena negativă o formă replicativă intermediară: pe catena negativă se sintetizează concomitent mai multe catene pozitive. Acestea fiind reprezentate preponderent cantitativ, pot servi ca: ARN viral care va fi încapsidat, ARN-m și catenă pentru alcătuirea de noi forme replicative (fig. 4.10). Eliberarea se realizează prin liza celulară.

2. **Virusuri cu ARN monocatenar la care ARN-m-ul este transcris de pe genomul viral.** ARN-ul viral este transcris de polimeraza din struc-

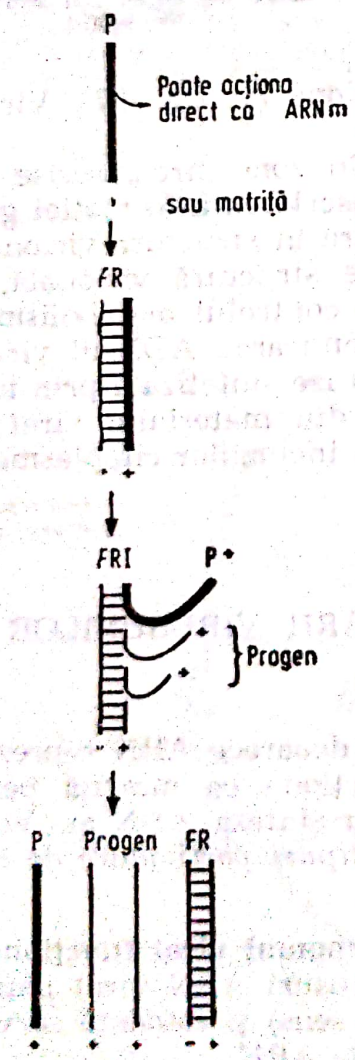


Fig. 4.10. **Replicarea virusului poliomielitic.**

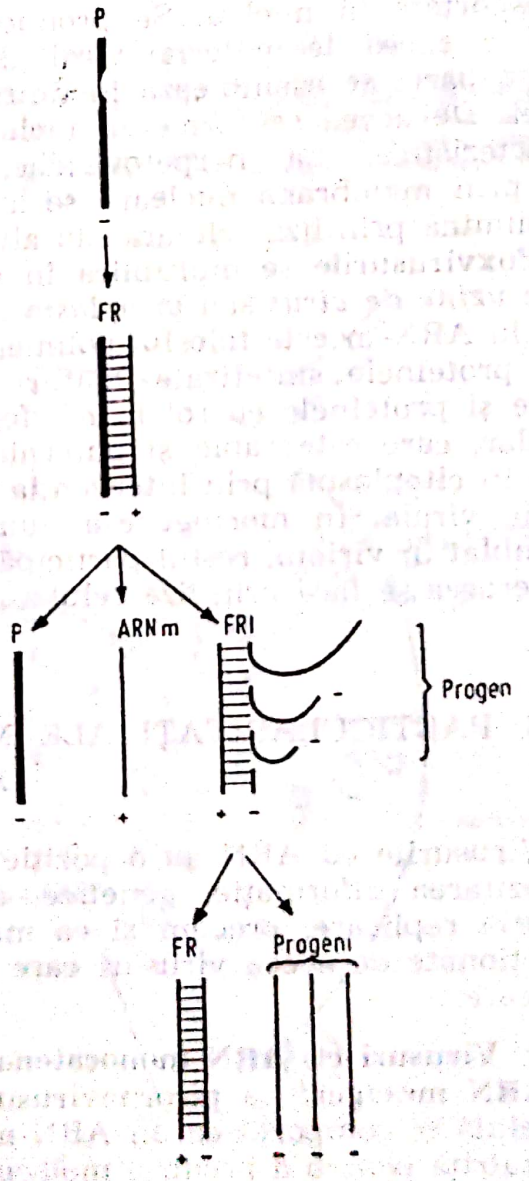


Fig. 4.11. **Replicarea virusului gripal:** ARN parental este reprezentat cu linie groasă; ARN-ul progen cu linie subțire; *P* — parental; *FR* — formă replicativă; *FRI* — formă replicativă intermediară.

Scanned with OKEN Scanner

tura virionului în ARN-m, care inițiază sinteza proteinelor de structură, inclusiv a polimerazei virale. Totodată ARN-ul viral parental servește ca matriță în replicare, cu apariția formelor replicative și a formelor replicative intermediare, cu mențiunea că enzima care intervine în acest proces este distinctă de cea care sintetizează ARN-m (fig. 4.11). Asamblarea nucleocapsidei se face în citoplasmă, iar la trecerea prin membrană se atașează anvelopa. Virusurile se eliberează din celulă prin înmugurire.

Myxovirusurile au un ARN constituit din 8 fragmente, fiecare din acestea fiind copiat într-un ARN-m. Multiplicarea virală este dependentă într-o modalitate încă neprecizată, de funcționarea aparatului genetic celular.

3. Virusuri cu ARN monocatenar a căror replicare se face printr-un ADN dublu catenar intermediar. Virusurile din familia Retroviridae se replică prin mecanisme inedite în lumea vie. Ele conțin o ADN-polimerază-ARN-dependentă, care realizează sinteza unei molecule hibride ARN-ADN. ADN-polimeraza -ARN-dependentă, care de asemenea intră în structura virionilor, duce la sinteza unei molecule de ADN dublu catenar (provirus) ce conține informația virală. Sub acțiunea unor endonucleaze și ligaze, prezente de asemenea în virion, molecula dublă de ADN-viral este integrată în ADN-ul celular (fig. 4.12). ARN-ul progen este transcris din ADN-ul viral integrat. Este necesară numai copierea unei părți din mesajul codificat de această moleculă pentru realizarea replicării virale.

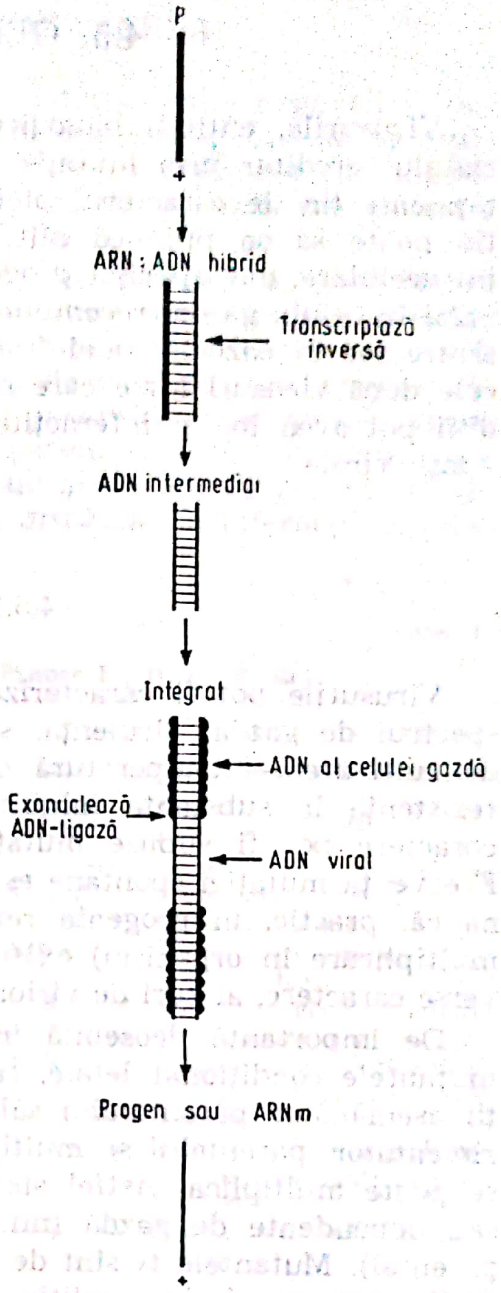


Fig. 4.12. **Replicarea retrovirusurilor.**

ADN-ul viral integrat poate să rămînă în stare de provirus pe genomul celular, fără să fie exprimată vreo componentă din mesajul său, replicîndu-se în generații succesive odată cu genomul celular. În anumite condiții, o parte din informații este transcrisă și tradusă, realizîndu-se în felul acesta transformarea celulară tumorală.

Integrarea ADN-ului viral în genomul celulei gazde reprezintă un mecanism prin care informația genetică virală poate fi transmisă genetic fără exprimare fenotipică.

Scanned with OKEN Scanner

4.5. GENETICA VIRALĂ

Virusurile, entităţi biologice, sînt supuse şi ele modificărilor materialului ereditar prin mutaţie şi recombinare. Există unele particularităţi care ţin de caracterul biologic special al virusurilor. Astfel, mutaţia poate să se producă atît în virion cît şi în timpul multiplicării intracelulare, dar apariţia progeniei mutant, necesită multiplicarea virusului în celula gazdă; *recombinarea* nu este posibilă decît în celula gazdă şi are loc în cazurile unei *infecţii concomitente* a unei celule de către cele două virusuri între care se produce recombinarea. În aceleaşi condiţii pot avea loc şi interacţiuni negative, cu repercusiuni asupra activităţii virale.

4.5.1. MUTAŢIILE

Virusurile pot fi caracterizate prin markeri diverşi ca de exemplu: spectrul de gazdă, virulenţa, structura antigenică, diverse caracteristici de cultivare — temperatură optimă, dimensiunea şi aspectul plajelor, rezistenţa la substanţe inhibitoare ale multiplicării, ş.a. Toate aceste caractere pot fi supuse mutaţiei spontane sau induse prin mutageni. Frecvenţa mutaţiei spontane este de ordinul 10^{-5}—10^{-7}, ceea ce înseamnă că, practic, în progenia rezultată într-un tub de cultură (sau prin multiplicare în organism) există virioni aparţinînd unor mutante în diverse caractere, alături de virioni cu caractere parentale.

De importanţă deosebită în cercetare şi în practica medicală sînt mutantele condiţionat letale, care se pot multiplica în anumite condiţii asemănător parentalului sălbatic; în alte condiţii, stabilite de experimentator, parentalul se multiplică nestînjenit, în timp ce mutantul nu se poate multiplica. Astfel sînt mutantele *ts* (sensibile la temperatură) sau dependente de gazdă (nu se pot multiplica la gazde infectate de parental). Mutantele *ts* sînt de obicei sensibile la temperaturile de 38°—40°C, care constituie condiţia restrictivă (non-permisivă) pentru multiplicare, deşi se pot multiplica la 28°—32°C. Importanţa practică deosebită a acestor mutanţi rezidă în faptul că adesea sensibilitatea la temperatură este asociată cu scăderea virulenţei. Printre astfel de mutante adaptate la „rece" se găsesc acelea care servesc la prepararea vaccinurilor cu virusuri atenuate vii. O altă categorie de mutaţii, a cărei importanţă este recunoscută, mai ales, în ultimul timp, sînt deleţiile care duc la apariţia particulelor virale defective interferente (DI). Este vorba de virusuri conţinînd un genom incomplet, care nu poate iniţia decît o infecţie abortivă; astfel de virioni pot să se multiplice în cazul unei infecţii concomitente cu un virion nedefectiv, a cărui multiplicare însă o stînjeneşte. Infecţia cu particule defective poate duce, înafară de interferenţă cu virusul complet la modificări celulare, inhibiţia metabolismului celulei gazdă, inducerea de antigene noi sau la transformare tumorală.

Scanned with OKEN Scanner

4.5.2. INTERACȚIUNI GENETICE ÎN INFECȚIILE VIRALE CONCOMITENTE (RECOMBINAREA)

În fenomenele de recombinare, ca și în interacțiunile negenetice, pot fi angajate nu numai virusuri complete sau active, capabile să se multiplice singure în celula infectată, dar și virusuri defective sau inactivate, care nu pot realiza decît parțial ciclul de multiplicare (infecție abortivă).

Se cunosc două modalități moleculare de recombinare: a. *recombinare intramoleculară*, în care genomul rezultat conține secvențe de nucleotide de la cei doi parentali, asociate într-o nouă moleculă unică; b. *reasortare genetică*, la virusurile cu genom segmentat de exemplu, orthomyxoviridae sau reoviridae, produsă ca urmare a încapsidării în același virion a unor segmente provenite de la ambii parentali. Infecția mixtă duce la formare de virioni cu caractere parentale și virioni cu genom recombinant. Genomurile virale pot participa la următoarele interacțiuni genetice (tabel 4.9):

Tabel 4.9

Schema interacțiunilor genetice (după Fenner F., D. O. White)

Fenomen	Parental 1	Parental 2	Progenic	Exemple
Recombinare intramoleculară	A *B* C*	A B C	A B C	Virusuri cu ADN, Picornaviridae
Reasortare	A/*B*/C	A/*B*/C	A/B/C	Orthomyxoviridae, Reoviridae
Hibridare	A B C D	X Y Z	A B C Z	Pierdere genă adenovirus (D), adaos genă SV_{40}(Z)
Reactivare încrucișată	$\not{A}$ $\not{B}$ C	A S T	A S C	Între un virus inactivat prin uv și un virus activ înrudit
Reactivare de multiplicitate	A B $\not{C}$	A $\not{B}$ C	A B C	Între virioni ai aceluiași virus, inactivați în gene diferite

* A = genă virală activă
B = genă mutant
$\not{C}$ = genă inactivată
A/*B* = genom segmentat

Recombinarea propriu-zisă are loc între virusuri active (înrudite), cu markeri genetici diferiți, întîlnită mai des la virusuri cu ADN, picornaviridae și cu genom segmentat.

Reactivarea are loc cînd unul dintre virusuri sau ambele sînt inactive. Se cunosc două forme: *reactivare încrucișată* (salvarea markerului), în care gene normale ale virusului inactivat intră într-un genom provenit în majoritate de la virusul activ (de exemplu, la virusuri gripale); *reactivare de multiplicitate*, în care virioni ai aceluiași virus, inactivați în gene diferite, se recombină într-un genom complet. Cum acest tip de reactivare apare frecvent la virusurile inactivate cu ultraviolete, această metodă de inactivare nu poate fi utilizată pentru obținerea vaccinurilor.

Scanned with OKEN Scanner

Hibridarea se produce între virusuri neînrudite (de exemplu, adenovirus uman și SV_{40}).

Integrarea genomului viral se produce în genomul celulei gazdă, ca provirus. Integrarea este posibilă pentru virusurile cu ADN și poate fi totală (întreg genomul) sau parțială (fragment din acidul nucleic viral). Fenomenul stă la baza transformării tumorale virale.

4.5.3. INTERACȚIUNI NEGENETICE ÎN INFECȚIILE VIRALE CONCOMITENTE

Infecțiile concomitente cu două virusuri pot duce la interacțiuni între acestea prin intermediul produșilor genici, fără a avea loc o recombinare:

Complementare: una sau mai multe proteine specificate de unul din virusuri ajută la multiplicarea celuilalt. De exemplu, doi mutanți în gene diferite, ai aceluiași virus; virus care infectează o celulă non-permisivă și un virus care se dezvoltă normal în celula respectivă (în celula de maimuță adenovirus uman și virusul simian SV_{40}); virus natural defectiv și un virus ajutător („helper") ca adenoasociat, replicat numai într-o celulă infectată de un adenovirus sau herpesvirus.

Amestec fenotipic și transcapsidare — proteine capsidale sau din peplos ale celor două virusuri se amestecă în același virion (de exemplu, peplomeri de virus gripal și paramyxovirus), genomul aparținînd numai unuia dintre ele. Dacă toată capsida este a unui virus și genomul al altuia avem transcapsidare (genom v. poliomielitic în capsidă de v. Coxsackie).

Heteroploidie: două genomuri diferite, încorporate în același virion (fig. 4.13).

Interferență: prezența în celulă sau în sistemul celular a unui virus „interferent" împiedică multiplicarea unui alt virus „interferat".

Stimularea: randamentul producției unui virus este mai mare în cazul infectării concomitente cu un al doilea virus, decît în absența lui. Rolul principal l-ar avea unele substanțe de origine celulară, dar induse viral-stimulonii.

Trebuie menționat în sfîrșit că, într-o infecție concomitentă există și posibilitatea multiplicării simultane , independente a celor două virusuri, fără vreo influențare reciprocă.

4.6. BACTERIOFAGUL

Bacteriofagii sau virusurile bacteriilor au fost descoperiți independent de T w o r t la stafilococi (1915) și d ' H é r è l l e la bacilii dizenterici (1917). Găsiți la toate genurile bacteriene, studierea lor a ocazionat cîteva descoperiri de importanță fundamentală în virusologie, unele chiar pentru întreaga biologie modernă.

Scanned with OKEN Scanner

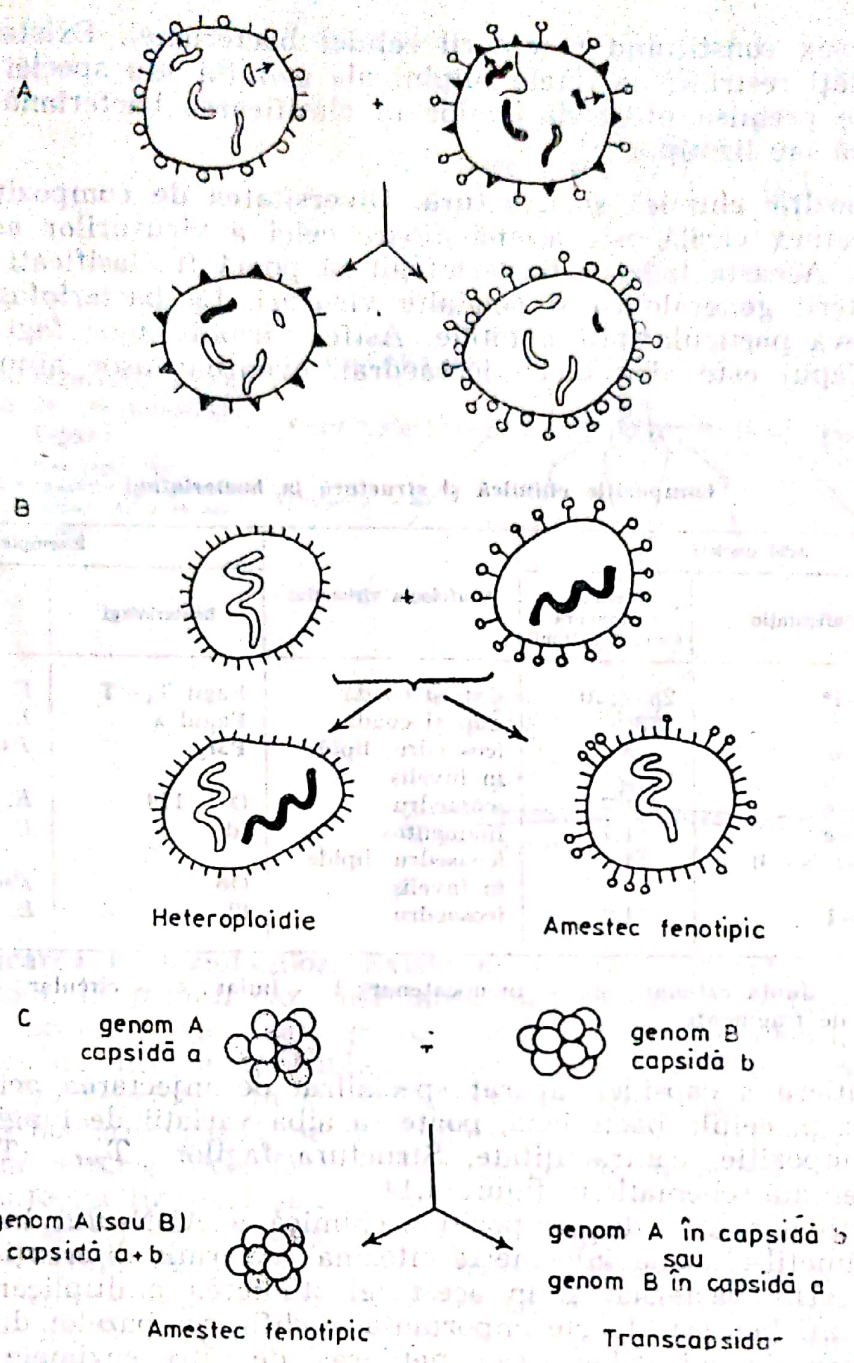


Fig. 4.13. Interacţiuni între virusuri:
A — reasortare genică: sînt prezentate două posibilităţi. Sînt marcate fragmentele genomului şi antigenele de suprafaţă. Săgeţile interioare arată corespondenţa genă-proteină;
B — heteroploidie şi amestec fenotipic la virusurile învelite;
C — amestec fenotipic şi transcapsidare la virusuri icosaedrice (B şi C — după F. Fenner şi D. O. White).

Nomenclatură şi specificitate de gazdă. Bacteriofagii sau fagii sînt denumiţi după gazda naturală şi poartă un simbol (de exemplu, T_1—T_7, λ, ∅ × 174 la *E. coli*). În general, un bacteriofag parazitează tulpini ale unei specii sau gen bacterian. Uneori spectrul de gazde este mai larg, cuprinzînd genuri înrudite (de exemplu, fagi care infectează tulpini de *Shigella* şi *Escherichia*). În anumite cazuri acest spectru este foarte restrîns (de exemplu, fagi ai *E. coli* care parazitează doar bacteriile masculine,

pilii de sex constituind receptorii celulei bacteriene). Existența acestei specificități restrînse la unele tulpini ale genului sau speciei bacteriene constituie premisa utilizării fagilor în clasificarea bacteriană — tipizarea fagică sau lizotipia.

Compoziție chimică și structură. Diversitatea de compoziție chimică și arhitectură virală este asemănătoare celei a virusurilor animale (tabel 4.10). Aceasta face ca bacteriofagii să poată fi clasificați după aceleași criterii generale ca și celelalte virusuri. La bacteriofagi se întîlnesc cîteva particularități notabile. Astfel virionii unor fagi au cap și coadă. Capul este, de obicei, icosaedral, eventual ușor alungit; coada,

Tabel 4.10

Compoziție chimică și structură la bacteriofagi

Acid nucleic		Morfologia virionului	Exemple	
Tip și configurație	Greutate moleculară ($\times 10^{-6}$ daltoni)		Bacteriofagi	Gazdă
ADN dc—l*	25—120	Cap și coadă	Fagii T_1—T	*E. coli*
	33	Cap și coadă	Fagul λ	*E. coli*
ADN dc—c	5	icosaedru, lipide în înveliș	PM_2	*Pseudomonas*
ADN mc—c	1.7	icosaedru	Ø × 174	*E. coli*
ADN mc—c	1.7	filamentos	fd	*E. coli*
ARN dc—l (s—3)	13	icoasedru, lipide în înveliș	Ø6	*Pseudomonas*
ARN mc—l	1.2	icosaedru	f2	*E. coli*

* dc — dublu catenar; mc — monocatenar; l — liniar; c — circular; s — segmentat, număr de fragmente

o diferențiere a capsidei, aparat specializat de injectarea acidului nucleic fagic în celula bacteriană, poate să aibă variații de lungime, detalii de compoziție, contractilitate. Structura fagilor T_{par} (T_2, T_4, T_6) este prezentată schematic în figura 4.14.

O particularitate de compoziție chimică a ADN-ului la fagii T_{par} (5-hidroximetil-citozină înlocuiește citozina) a permis diferențierea ADN fagic de ADN bacterian și în acest fel studierea multiplicării fagilor. Pentru mulți fagi este foarte importantă modificarea bazelor din ADN-ul lor (de exemplu, glicozilarea sau metilarea) de către enzimele de modificare ale bacteriei gazdă; ADN-ul cu baze nemodificate va fi hidrolizat de către endonucleazele de restricție ale bacteriei. De exemplu, ADN-ul fagului P_2 multiplicat în celule de *Shigella* are anumite baze modificate, ceea ce îl face rezistent la endonucleazele de *Shigella*, dar nu și față de endonucleazele de restricție ale *E. coli* B. Infectînd o cultură de *E. coli* B cu fag multiplicat pe *Shigella*, în majoritatea bacteriilor ADN-ul fagic va fi hidrolizat de enzimele de restricție ale *E. coli* B. Foarte rar (10^{-4} din particulele fagice) ADN-ul va fi modificat de enzimele de modificare ale *E. coli* B, devenind rezistent la enzimele de restricție, ceea ce îi va permite fagului P_2 să se multiplice normal în *E. coli* B. Această *modificare fenotipică* nu ereditară, *controlată de gazdă*, este unul din fenomenele importante în conferirea unei specificități de gazdă restrînsă.

Scanned with OKEN Scanner

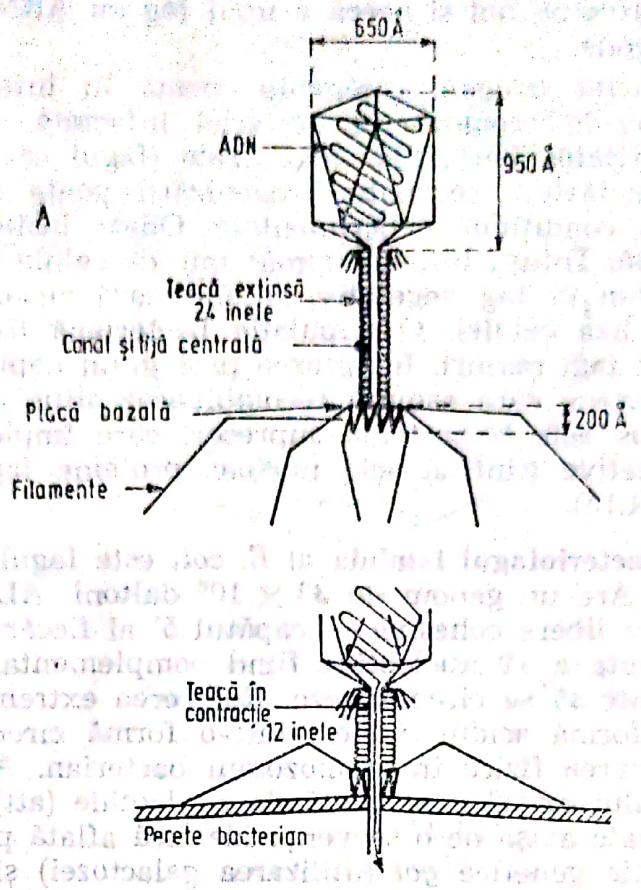


Fig. 4.14. Structură cu cap și coadă la bacteriofagii T-par:

A — virion fagic liber; B — virion adsorbit pe peretele bacterian, injectînd ADN în bacterie.

Multiplicarea bacteriofagilor. Există două tipuri de relație fag-bacterie infectată. În primul caz, infectarea bacteriei duce la formarea de noi virioni, bacteria este lizată și fagul este eliberat în mediu; infecția litică sau ciclul litic de multiplicare, iar fagul în multiplicare poartă numele de *fag vegetativ*. În al doilea caz, genomul fagic se integrează în genomul bacteriei gazdă, se multiplică concomitent cu aceasta și se distribuie la celulele fiice, fără a distruge celula, devenind un replicon epizomal: infecția lizogenă sau ciclul lizogen de multiplicare. Genomul integrat al fagului se numește *profag*, iar celula bacteriană cu profag se numește *celulă lizogenizată* sau *lizogenă*. Bacteriofagii care infectează doar litic se numesc *virulenți*, iar cei care pot lizogeniza se numesc *temperați*. Este posibil ca un fag să se comporte virulent față de o tulpină bacteriană și temperat față de o tulpină înrudită.

Ciclul litic se petrece în linii mari asemănător multiplicării productive a virusurilor animale. Are loc mai întîi adsorbția la receptorii de pe suprafața celulei bacteriene prin fibrele sau spinii cozii; ancorarea fermă la suprafața bacteriei prin placa bazală; liza enzimatică a mureinei în zona de atașare; injectarea acidului nucleic prin contractarea proteinelor cozii, străpungerea peretelui bacterian de către tija centrală și trecerea ADN-ului prin canalul cozii din capul bacteriofagului în celula bacteriană. Învelișul proteic rămîne la exterior (v. fig. 4.14). Etapa de sinteză a acidului nucleic și a proteinelor virale, a căror asamblare o va produce fagul progen, este diversificată după tipul de acid nucleic, număr de gene, ș.a. Există astfel deosebiri esențiale între multiplicarea unui fag mare ca T_4 care induce sinteza cîtorva zeci

de proteine noi şi aceea a unui fag cu ARN, ca MS_2, care nu are decît trei gene.

Ciclul lizogen. Lizogenia constă în integrarea genomului fagic ca profag în cromozomul bacteriei infectate. La infectarea unei culturi, majoritatea bacteriilor sînt lizate (fagul se multiplică litic), cîteva sînt lizogenizate. Frecvenţa lizogenizării poate fi influenţată prin modificarea condiţiilor experimentale. Odată instalată, starea de profag este stabilă. Totuşi, într-un număr mic de celule (10^{-5}—10^{-4}) profagul trece spontan în fag vegetativ, se formează virioni fagici care se eliberează prin liza celulei. O populaţie bacteriană lizogenizată conţine astfel şi cîţiva fagi maturi. Integrarea profagului depinde de cîteva gene fagice şi bacteriene care asigură recombinarea situs-specifică şi de gene a căror produs este o proteină supresor, care împiedecă exprimarea funcţiilor vegetative (sinteză acid nucleic, proteine fagice, asamblarea în virioni) (fig. 4.15).

Bacteriofagul lambda al *E. coli* este fagul temperat cel mai bine studiat. Are un genom de 33×10^6 daltoni, ADN dublu catenar, liniar, cu capete libere cohesive — capătul 5' al fiecărui lanţ este liber, cele două secvenţe a 12 nucleotide fiind complementare (fig. 4.16). Acest fapt îi permite să se circularizeze. Refacerea extremităţii lanţurilor prin ligază transformă acidul nucleic într-o formă circular covalentă, aptă pentru integrarea fizică în cromozomul bacterian. Aproximativ în mijlocul genomului există o secvenţă de nucleotide (att) prin care ADN-ul lambda se poate ataşa de o secvenţă identică aflată pe cromozomul *E. coli*, între locurile genetice *gal* (utilizarea galactozei) şi *bio* (sinteza biotinei). Recombinarea celor doi acizi nucleici duce la integrarea fizică a genomului lambda (alţi fagi temperaţi pot avea cîteva puncte de ataşare, nu doar unul singur, eventual se pot integra în orice punct de pe cromozom, cum este fagul Mu la *E. coli*).

Încetarea funcţionării represorului duce la sinteza enzimelor necesare desprinderii genomului din cromozom, a exciziei printr-un proces

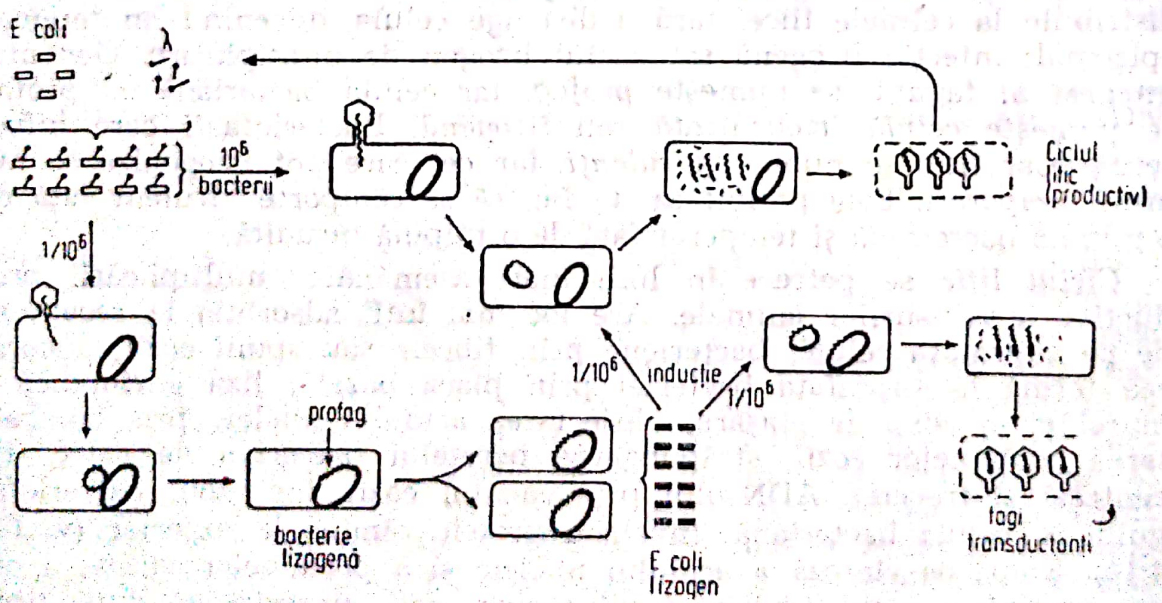


Fig. 4.15. Modelul lizogenizării *E. coli* de către bacteriofagul λ.
Condiţiile fiziologice (temperatură, oxigenare, mediul de cultură etc.) şi mutaţiile pot influenţa foarte mult frecvenţele notate pe figură.

Scanned with OKEN Scanner

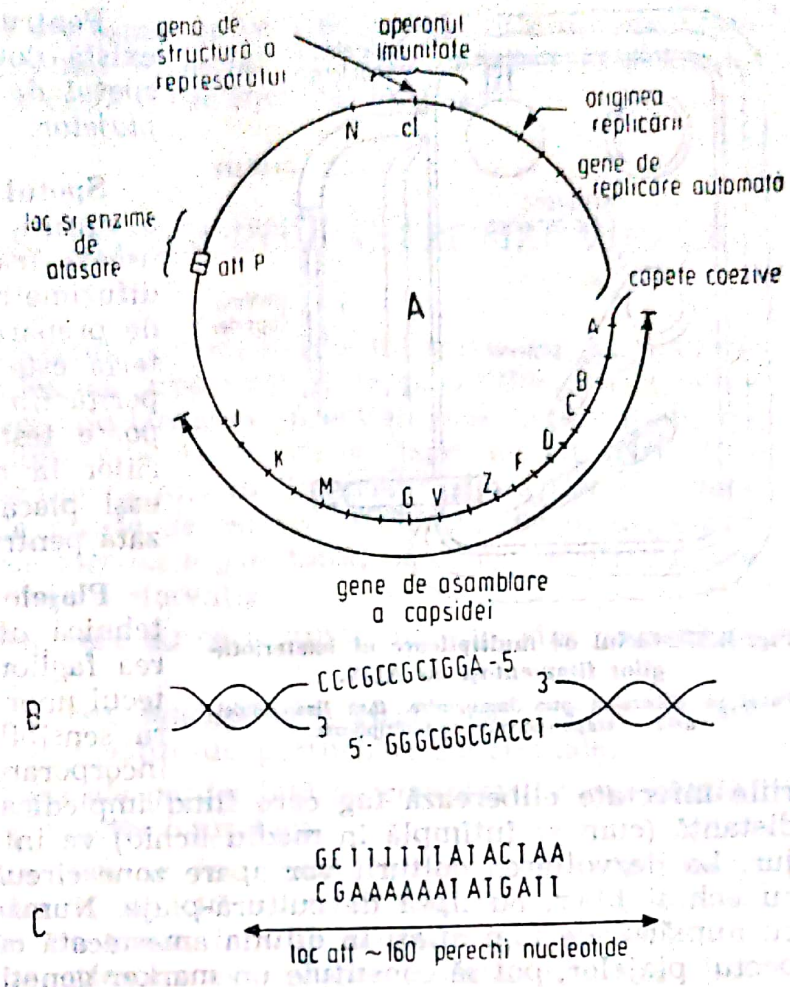


Fig. 4.16. Genomul bacteriofagului:

A — harta genetică. Sînt marcate principalele regiuni genetice. Funcţionarea regiunii de imunitate determină multiplicarea litică a fagului sau integrarea ca profag prin locul att, cu lizogenizarea bacteriei;

B — capetele coezive permit circularizarea moleculei de ADN (cele două secvenţe sînt complementare);

C — locul att are în mijloc o secvenţă identică în moleculele ADN fagic şi ADN bacterian, la nivelul căreia se produce recombinarea situs-specifică ce duce la integrare.

invers integrării. În general, excizia se face corect, însă există posibilitatea ca tăierea lanţurilor nucleotidice să se facă greşit, astfel încît în cromozomul bacterian rămîne o parte din genomul lambda, iar în acidul nucleic fagic este incorporat material genetic bacterian, fie din zona *gal*, fie din zona *bio*. Un astfel de fag poate efectua o transducţie localizată.

Pseudolizogenia. Lizogenia reprezintă un model de persistenţă a unui virus într-o populaţie celulară, caracterizată prin faptul că fiecare celulă poartă fag într-o formă inactivă (profag). Există şi alte situaţii în care un fag virulent persistă într-o populaţie bacteriană; sînt sensibile, la un moment dat, doar o parte din celule (există un „ciclu" de sensibilitate şi rezistenţă); multiplicarea virală este lentă, bacteria infectată poate da naştere la descendenţi care nu sînt infectaţi alături de alte celule fiice, care rămîn infectate şi se lizează. Unii fagi pot fi eliberaţi din celulă prin înmugurire, fără a produce liza (fig. 4.17). Aceste fenomene au primit denumirea de pseudolizogenie şi pot oferi modele de studiu pentru infecţiile virale persistente.

Metode de evidenţiere a lizei fagice şi a lizogeniei. Infecţia litică poate fi evidenţiată în culturi în mediu lichid sau în cultură pe mediu solid. În mediu lichid — o suspensie de fagi adăugată unei culturi, incubată apoi la temperatura potrivită — duce la clarificarea culturii.

Scanned with OKEN Scanner

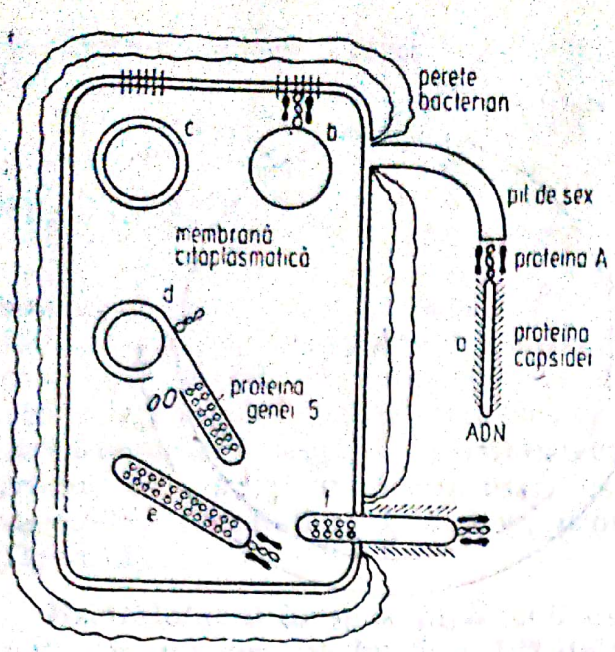


Fig. 4.17. Ciclul de multiplicare al bacteriofagilor filamentoşi cu ADN.
Fagul se eliberează prin înmugurire, fără liza celulei: a–f — etape succesive în multiplicare.

Pentru culturi pe mediu solid există două tehnici principale: *spotul de bacteriofagie* şi *metoda plajelor.*

Spotul de bacteriofagie — pe o cultură însămînţată în pînză şi uscată (ca pentru antibiograma difuzimetrică) se pune o picătură de preparaţie fagică şi, dacă bacteria este sensibilă, în zona acoperită nu se dezvoltă cultură; se poate testa sensibilitatea bacteriilor la mai mulţi fagi pe aceeaşi placă — este tehnica utilizată pentru lizotipie.

Plajele de bacteriofagie — tehnică utilizată pentru numărarea fagilor litici, constă în amestecul unor diluţii de fag cu cultura sensibilă şi însămînţarea prin încorporare în mediu solid. Bacteriile infectate eliberează fag care fiind împiedicat să se răspîndească la distanţă (cum se întîmplă în mediu lichid) va infecta doar bacteriile din jur. La dezvoltarea culturii vor apare zone circulare, în general vizibile cu ochiul liber, cu lipsă de cultură-plaje. Numărul plajelor corespunde cu numărul de fagi aflaţi în diluţia amestecată cu cultura. Mărimea, aspectul plajelor, pot să constituie un marker genetic uşor de recunoscut.

Prezenţa unui fag lizogen într-o cultură bacteriană se evidenţiază, în general, tot prin liză. Pentru aceasta cultura lizogenă se amestecă cu cultura unei bacterii, pe care fagul temperat respectiv o infectează litic — cultură indicatoare. Fagii liberi din cultura lizogenă vor produce plaje.

Aplicaţiile fenomenului de bacteriofagie. În biologia bacteriilor, fagii sînt promotorii a două fenomene importante: *transducţia* şi *conversia lizogenă.*

În medicină, aplicaţiile practice sînt *lizotipia* şi *tratamentul prin bacteriofag.*

Lizotipia este o clasificare în interiorul unui gen sau specii bacteriene, pe baza sensibilităţii sau rezistenţei faţă de un set de bacteriofagi. Se creează diviziuni taxonomice mai restrînse — tipuri fagice (lizotipuri).

Sînt determinate astfel de scheme de clasificare avînd o utilizare de rutină, în primul rînd, pentru *Salmonella (S. typhi, S. paratyphi* B, *S. typhimurium)* şi stafilococul aureu, apoi pentru bacilii difterici, bacilul piocianic, ş.a. Această precizare de taxonomie este de mare ajutor în ancheta epidemiologică, mai ales pentru depistarea sursei de infecţie şi precizarea căilor de răspîndire epidemică a unei bacterii.

Tratamentul prin bacteriofag are o utilitate restrînsă. În bolile generalizate efectul este incomplet (fagul nu ajunge în toate locurile unde se multiplică bacteriile), repede anulat de anticorpii care apar faţă de pro-

Scanned with OKEN Scanner

teinele fagice. Tratamentul are şanse de reuşită în infecţiile de *suprafaţă* (tub digestiv, căi urinare); chiar în astfel de cazuri efectul este inconstant şi imprevizibil şi din această cauză încercat arareori.

4.7. PATOGENEZA ŞI CONSECINŢA INFECŢIEI VIRALE

Infecţia virală are caracterele generale ale infecţiei, cu particularităţi care sînt legate, mai ales, de proprietăţile de parazitism strict celular al virusurilor. De aceea, declanşarea infecţiei este determinată de existenţa celulelor susceptibile faţă de un virus şi de accesul virionilor la celulele susceptibile. Rezultă de aici că, în măsură hotărîtoare, infecţia virală este conturată de *poarta de intrare* a virusurilor în organism şi de *difuzarea şi localizarea într-un organ ţintă*, pentru care virusul are tropism şi se multiplică în mod preferenţial.

Perturbările homeostaziei, care au ca rezultat infecţia, sînt consecinţa a două categorii de procese:

a. *afectarea celulară în cursul multiplicării virale*, care poate să îmbrace diferite efecte citopate, însoţite de perturbări funcţionale;

b. *manifestările de răspuns ale gazdei faţă de complexul virus-celulă*, mai ales inflamaţia virală şi reacţia imunitară.

Pe un alt plan, infecţia care se instalează într-un organism poate să fie însoţită de sémne clinice, *infecţie manifestă ca boală*, sau evoluează fără apariţia semnelor de boală, *infecţie inaparentă*. Pentru multe virusuri, forma ultimă de manifestare este preponderentă, mai ales cînd incidenţa maximă a infecţiei se înregistrează la copii.

Pînă de curînd în centrul atenţiei, s-a situat manifestarea acută, episodul acut al infecţiei, care după o perioadă variabilă, dar scurtă de timp, se încheie cu eliminarea virusului din organism. Astăzi a devenit evident, că alături de manifestarea acută, infecţia virală poate avea şi alte consecinţe importante: posibilitatea instalării unei infecţii persistente, instalarea unui sindrom infecţios congenital cu efecte teratogene, declanşarea unor procese imunopatologice.

4.7.1. CARACTERISTICILE INFECŢIEI VIRALE CA MANIFESTARE ACUTĂ

Poarta de intrare conturează în mare măsură atît manifestările clinice, cît şi difuziunea infecţiei în populaţiile umane. Mucoasa tractului respirator şi intestinul constituie porţile de intrare pentru un număr mare de virusuri. Aceste mucoase pot să reprezinte în acelaşi timp şi organul ţintă, ceea ce dă caracteristicile generale de infecţie respiratorie sau de enterită. Pentru unele infecţii, multiplicarea la poarta de intrare este urmată de generalizare (tabel 4.11). Poarta transcutană se întîlneşte la acele virusuri care, pentru a pătrunde în ţesuturile gazdei, sau în torentul circulator, trebuie să treacă peste bariera tegumentară, printr-unul din modalităţile prezentate în acelaşi tabel. Pentru unele infecţii, între

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.11

Poarta de intrare a infecţiilor virale

A. Mucoasa aparatului respirator	1. Mucoasa reprezintă şi organul ţintă: pentru virusurile gripal, paragripale, adeno, respirator sinciţial, herpeto, corona etc. 2. Mucoasa asigură multiplicarea primară, urmată de generalizare, pentru virusurile oreionului, rujeolei, variolei, meningitei chorio-limfocitare
B. Mucoasa tractului intestinal	1. Mucoasa asigură multiplicarea primară, urmată de generalizare: virusul hepatitei A, enterovirusuri 2. Mucoasa reprezintă şi organul ţintă: rotavirusuri, unele tipuri de adenovirusuri
C. Transcutană	Pot interveni: 1. Microtraumatisme: virusul verucilor umane, poxvirusul care produce moluscum contagiosum şi cel al nodurilor lăptarilor 2. Înţepături de insectă: arbovirusuri 3. Muşcătură de animal: virusul rabic 4. Prin injecţii: virusul hepatitei B
D. Mucoasa organelor genitale	*V. herpes simplex* tip 2, v. verucilor umane

care virusul herpetic de tip 2, poarta de intrare o constituie mucoasa organelor genitale. Unele virusuri pot infecta transplacentar fătul, în cursul unei viremii.

Generalizarea infecţiei. Unele virusuri, după multiplicarea lor la poarta de intrare, pot să se generalizeze prin viremie. Calea principală de pătrundere în circulaţia generală este reprezentată de reţeaua limfatică, fără a exclude însă şi participarea directă a vaselor sanguine. În torentul circular, virionii se găsesc liberi în plasmă sau vehiculaţi de celule — polimorfonucleare, monocite şi mai rar limfocite — în care virusurile se pot multiplica sau prin aderare de hematii şi trombocite.

Pentru a ajunge şi a se localiza în organul ţintă, viremia trebuie probabil să fie persistentă şi de nivel înalt. Pentru a realiza aceste condiţii, pe baza observaţiilor clinice şi experimentale, s-a conturat următoarea secvenţă de evenimente: după multiplicarea locală la poarta de intrare, se produce prima viremie, cu localizarea virusului într-un focar primar de multiplicare (sistemul reticulo-endotelial), urmată de o a doua viremie, cu atingerea unui organ ţintă, în raport de care se definesc: infecţii generalizate cu erupţie tegumentară şi infecţii generalizate cu afectarea S.N.C.

4.7.2. INFECŢII GENERALIZATE

1. *Infecţii generalizate cu erupţie tegumentară (febre eruptive).* În variolă, varicelă şi herpes, leziunile cutanate sînt consecinţa multiplicării virusului. Erupţia cutanată rezultată din localizarea virusurilor în tegumente se caracterizează prin următoarele leziuni evolutive: maculă, papulă, veziculă şi pustulă. O dilatare persistentă a vaselor dermice produce o maculă, care devine papulă, dacă se însoţeşte de edem şi infil-

Scanned with OKEN Scanner

trație celulară. Interesarea ulterioară a epidermei duce la formarea unei vezicule, care se transformă în pustulă, dacă apare un exsudat celular abundent. Ulterior leziunea se ulcerează sau se acoperă cu o crustă. Exantemul poate fi acompaniat de erupție pe mucoasa bucală: enantem. În figura 4.18 sînt schițate aceste evenimente în variolă.

În rujeolă și rubeolă erupția maculo-papulară este consecința formării complexelor imune antigen (virus) — anticorpi, pe pereții vaselor din derm.

2. *Infecții generalizate cu interesarea S.N.C.* Pentru ca virionii prezenți în torentul circulator în cursul viremiei să pătrundă în S.N.C., trebuie să traverseze bariera hematomeningială, fie prin vehicularea lor prin leucocite (arbovirusuri), fie prin multiplicarea în plexul coroid, cu

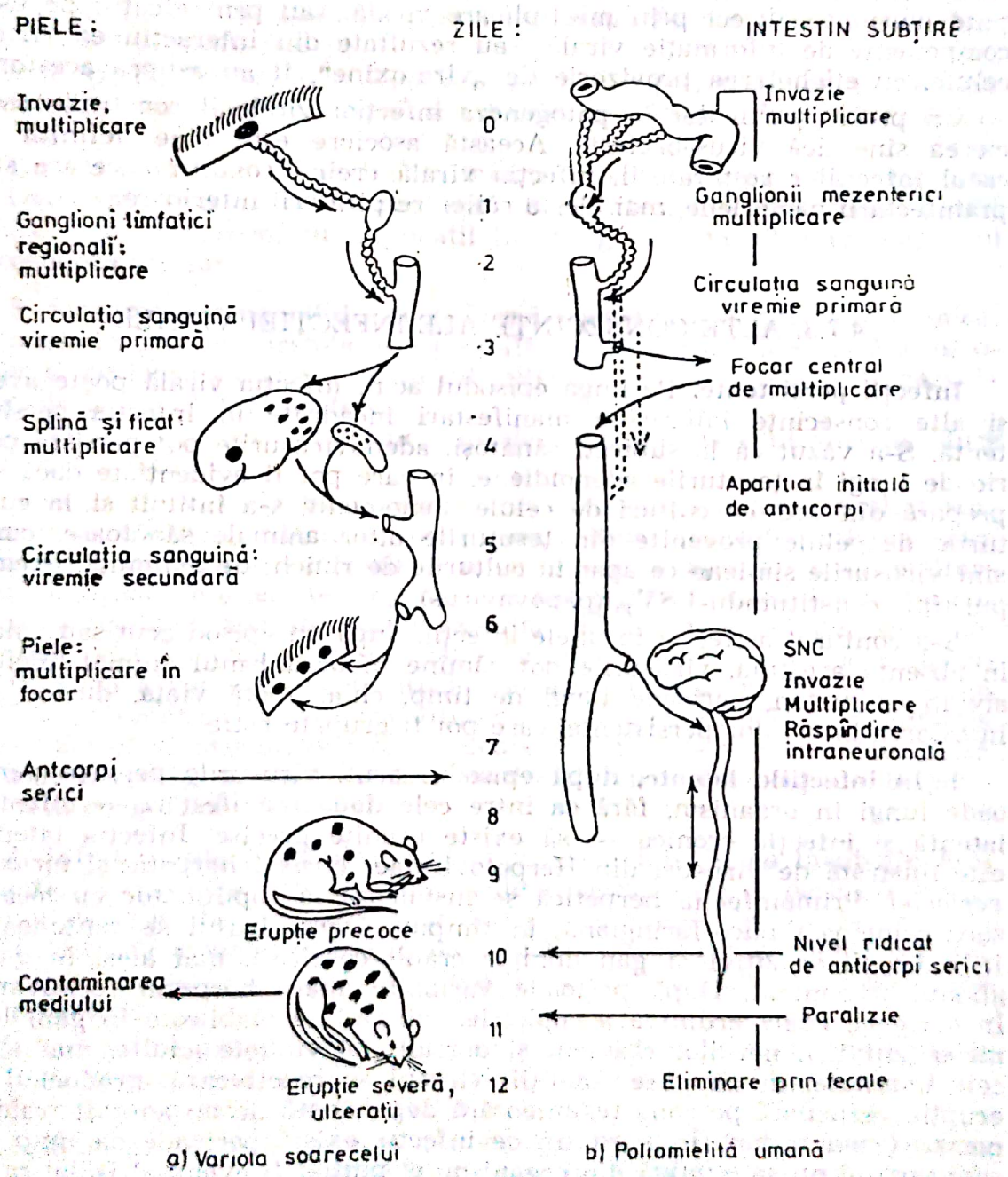


Fig. 4.18. Patogeneza variolei la șoarece și a poliomielitei la om (schema).

Scanned with OKEN Scanner

producerea mai ales de meningită (enterovirusuri). Virusul se poate localiza în SNC și în urma difuzării de la periferie, pe traiectul nervilor periferici, ca în cazul virusului rabic. În figura 4.18 sînt redate etapele de generalizare în poliomielită.

Alte organe țintă în urma viremiei pot fi reprezentate de ficat (hepatitele virale, febră galbenă), de țesuturi glandulare (parotida, pancreasul pentru virusul oreionului).

* * *

Se mai poate adăuga că atît în infecțiile localizate, cît și în cele generalizate, există posibilitatea să fie interesate și *alte organe* decît cele ținte obișnuite, direct prin multiplicare virală sau prin efectul pe care componente de informație virală, sau rezultate din interacțiunea virus-celulă, cu etichetarea provizorie de „virotoxine", îl au asupra acestora.

Un proces particular în patogeneza infecției virale îl constituie asocierea sinergică virus-bacterie. Această asociere este bine definită în cazul infecțiilor respiratorii, infecția virală creind condiții necesare suprainfectării bacteriene, mai ales a căilor respiratorii inferioare.

4.7.3. ALTE CONSECINȚE ALE INFECȚIEI VIRALE

Infecții persistente. Pe lîngă episodul acut, infecția virală poate avea și alte consecințe îmbrăcînd manifestări încadrate în infecția persistentă. S-a văzut că la subiecți sănătoși, adenovirusurile pot persista perioade lungi în țesuturile adenoidiene, în care pot fi evidențiate dacă se prepară din acestea culturi de celule. Fenomenul s-a întîlnit și la culturile de celule provenite din țesuturile altor animale sănătoase, cum sînt virusurile simiene ce apar în culturile de rinichi de maimuță, exemplul tipic constituindu-l SV_{40} (papovavirus).

S-a conturat astfel că în unele infecții, după un episod acut sau chiar în absența acestuia, virusurile pot rămîne în organismul animal, inclusiv în cel uman, perioade lungi de timp, chiar toată viața, ducînd la instalarea infecțiilor persistente, care pot fi grupate astfel:

1. **În infecțiile latente,** după episodul acut, virusurile persistă perioade lungi în organism, fără ca între cele două manifestări — infecția latentă și infecția cronică — să existe granițe precise. Infecția latentă este ilustrată de virusuri din Herpetoviridae: *virusul herpetic* și *virusul varicelei*. Primoinfecția herpetică se instalează la copilul mic cu localizare principală buco-faringiană, în timpul căreia virusul se cantonează în neuronii senzitivi ai ganglionilor cranio-cervicali, mai ales, în ganglionul trigeminal. După perioade variabile apare herpesul recidivant. În varicelă, boală eruptivă a copilăriei, virusul se stabilește în ganglionii senzitivi ai nervilor cranieni și dorsali. La vîrstele adulte, mai ales cele înaintate, în anumite condiții, virusul se reactivează, producînd o erupție veziculară pe zona tegumentară dependentă de un anumit traiect nervos (zona zoster). În acest tip de infecție există perioade de timp în care virusul nu se elimină din organism, el putînd fi eventual izolat prin cultivarea ganglionilor nervoși.

Scanned with OKEN Scanner

2. **În infecțiile cronice,** după episodul acut, virusul infectează în mod cronic organismul, putînd fi evidențiat în toată perioada de evoluție a infecției. Exemplu caracteristic îl constituie hepatita cu *virus B*, în care antigenul (HBs) caracteristic poate fi evidențiat în sînge în cantitate mare (10^{10}—10^{12} particule pe ml), ceea ce explică infecțiozitatea mare a sîngelui acestor subiecți. Virusul este de asemenea prezent în hepatocit. La o parte din cei cu o astfel de infecție persistentă, se instalează, cu intervenția unor mecanisme imuno-patologice, o hepatită cronică evolutivă.

În mod asemănător, la o mare parte din populația umană este prezent un portaj cronic cu virus citomegalic, care poate fi izolat din glandele salivare, rinichi și leucocite. Rareori, virusul poate fi reactivat în condiții de imunosupresie sau transmis prin transfuzie. O infecție cronică se întîlnește, de asemenea, cu *herpesvirus Epstein-Barr*, care infectează selectiv limfocitele B.

Este posibil ca procese similare să fie responsabile de unele boli „autoimune" ale omului, cum sînt bolile de colagen, lupusul eritematos, ș.a.

Un tip particular de astfel de infecții cronice îl constituie cele date de *Oncornavirinae*, cu instalarea în evoluția infecției a unei relații particulare virus-organism, cu implicații în oncogeneza virală (vezi capitolul oncogeneza virală).

3. **Sindromul congenital** este o formă particulară a infectării cronice. În unele infecții cu viremie este posibilă trecerea transplacentară a virionilor și declanșarea unei infecții intrauterine în toate etapele de dezvoltare, de la ou, pînă la naștere.

Infecția cu virusuri puternic citocide, cum este virusul variolic, duce la moartea fătului.

Infecția cu virusuri necitocide (virusul rubeolei) are ca rezultat sindromul congenital. Infectarea unor celule împiedică diferențierea celulară, cu o dezvoltare anormală a unor organe și apariția unor malformații congenitale (efect teratogen), care pot interesa ochiul (de la retinopatie la cecitate), aparatul cardiovascular, S.N.C. (microcefalie, retardare mintală) etc. La copilul născut cu sindrom congenital are loc o distribuire largă a virusului în țesuturi care este eliminat pe perioade lungi, pînă la un an după naștere, constituindu-se în surse principale de infecție. S-a văzut că sindromul congenital poate fi dat și de virusul citomegalic, virusul herpetic, probabil virusul varicelei, virusul Coxsackie B (malformații congenitale cardiace).

4. **Infecții lente** (slow virus infections) sau **infecții cu incubație prelungită,** în care, așa cum le arată și denumirea, după o perioadă lungă, de ani de zile, de incubație apar leziuni, mai ales de tip degenerativ S.N.C. Pentru această categorie de infecții, informații prețioase au fost aduse de medicina comparată, medicii veterinari fiind cei care le-au sesizat inițial.

Într-o primă grupă, produsă de reprezentanți din Lentivirinae (familia *Retroviridae*), se includ o *encefalită subacută* și *boala Maedi* — pneumonia progresivă, ambele întîlnite la om.

A doua grupă este formată din *encefalitele spongioase* descrise prima dată tot la oi, sub denumirea de *scrapie* (*to scrape* = a scărpina). Boala se manifestă, după o incubație de 1—3 ani, prin tremurături,

Scanned with OKEN Scanner

prurit, ataxie, paralizii cu evoluție lentă și inevitabil moarte. Leziunile histopatologice se limitează la S.N.C. și constau într-o modificare cu aspect spongios a substanței cenușii. Sînt dovezi care susțin intervenția etiologică a unor agenți infecțioși de tipul viroizilor.

La om au fost descrise două boli similare: a. Kuru, boală cu apariție restrînsă la o populație din Noua-Guinee, în care Gajdusek a demonstrat că transmiterea bolii este legată de o formă de canibalism religios (femeile consumau fără o pregătire termică prealabilă creierul rudelor decedate). După 1950, interzicerea acestui obicei a dus la o scădere remarcabilă a infecției. S-a stabilit, că după o perioadă de 5—10 ani, boala se manifestă prin tremurături, ataxie și moarte în decurs de un an. Infecția a fost transmisă experimental la cimpanzei și alte maimuțe, caracterizîndu-se prin instalarea, după o incubație de 1—3 ani, a unei encefalite spongioase, transmisibilă în treceri succesive. b. *Boala Creutzfeld-Jakob* sau *demența presenilă subacută* are o răspîndire cosmopolită și cu o incidență extrem de redusă. Interesează persoane de vîrstă mijlocie la care apar contracții musculare, ataxie și demență severă progresivă, cu sfîrșit letal în 8—12 luni. Boala a fost transmisă la cimpanzei și alte maimuțe cu filtrat obținut din creierul decedaților. Agenții etiologici ai acestor boli umane nu sînt cunoscuți, unele date sugerînd posibilitatea etiologiei cu agenți cu proprietățile viroizilor.

O a treia grupă este constituită din boli cronice degenerative ale S.N.C., produse de virusuri convenționale:

Panencefalita subacută sclerozantă (PESS) care apare la cîțiva ani după trecerea prin rujeolă, instalîndu-se cu o evoluție subacută, o pierdere treptată a funcției cerebrale, cu sfîrșit letal în 6—12 luni. Este dovedită intervenția etiologică a v. rujeolei, iar titrele ridicate de anticorpi în *lcr* au valoare de diagnostic.

Leucoencefalopatia multifocală progresivă se întîlnește rar la subiecți cu deficiențe imunitare datorită altor boli (leucemie cronică, boala Hodgkin, limfosarcoame etc.) sau terapie imunosupresoare. Sînt multe dovezi care susțin că reprezentanți ai familiei *Papovaviridae* (virusul JC și virusul BK) sînt agenții etiologici ai acestei boli.

Mielopatia neurooptică subacută este un tip de polinevrită cu răspîndire mai mare în unele zone (Japonia), produsă de un virus din *Herpetoviridae*.

Scleroza multiplă constituie, prin frecvența cu care se întîlnește, cea mai importantă boală demielinizantă a S.N.C. Datele epidemiologice au arătat că este probabilă o etiologie virală, incriminîndu-se, mai ales virusurile paragripale și v. rujeolei. Este sugerată probabilitatea ca și alte boli cronice degenerative să aibă etiologic o intervenție virală.

Mecanismele patogenetice care stau la baza manifestărilor din infecția persistentă sînt multiple și încă insuficient precizate. Unii dintre agenții infecțioși care produc encefalite spongioase au caracterele viroizilor, fiind lipsite de capacitatea de a induce un răspuns imun. Alte virusuri, cum sînt în special cele din familia *Retroviridae*, pot să persiste în celulă ca provirus integrat în cromozomii celulari. Multe din virusurile implicate în acest tip de manifestări au un efect citopatogen puțin exprimat, putînd să se multiplice în mod echilibrat (stady-state), cu menținerea capacității de diviziune a celulei infectate. În consecință,

Scanned with OKEN Scanner

reacţia inflamatorie este absentă sau de intensitate redusă, fără efectul favorabil de eliminare al virusului.

De majoră importanţă pentru instalarea şi menţinerea infecţiei persistente este înlocuirea virusurilor virulente, de către unele mai puţin virulente, în special, *mutante termosensibile*, ca şi inhibarea multiplicării virusului virulent prin particule defective (autointerferenţă).

În afară de acestea, în infecţia persistentă intervin condiţii de gazdă. Astfel, virusurile care produc infecţii latente pot să se cantoneze în structuri protejate faţă de reacţia imună, cum sînt neuronii (v. herpetic, v. varicelei) sau limfocitele B (v. Epstein-Barr, v. citomegalic).

În general, se constată alterări ale răspunsului imun. Unele infecţii virale sînt acompaniate de efecte imunosupresoare. Alteori, reacţia de I.M.C. este insuficientă datorită prezenţei anticorpilor blocanţi, sau a complexelor imune, care împiedecă limfocitele citotoxice să acţioneze asupra celulelor ţintă infectate. Perturbările răspunsului imun sînt apoi o consecinţă a multiplicării virusurilor în limfocite şi macrofage.

Dirijarea cercetărilor spre o cunoaştere din ce în ce mai profundă a acestor mecanisme, poate duce la noi direcţii de înţelegere şi alte dimensiuni de apreciere a rolului infecţiei persistente în conturarea afecţiunilor umane cronice.

4.8. APĂRAREA ŞI IMUNITATEA ÎN INFECŢIILE VIRALE

4.8.1. GENERALITĂŢI

Intervenţiile apărării în infecţia virală se suprapun celor din apărarea antiinfecţioasă: *evitarea reinfecţiei, a primoinfecţiei* (în primul rînd, prin profilaxie specifică) şi *vindecarea din infecţie cu eliminarea virusului din organism.* Aceste manifestări constituie efectul biologic favorabil.

În relaţia virus-organism gazdă se pot constata şi efecte biologice nefavorabile ale imunităţii. Astfel, în evoluţia unei infecţii mecanismele imune pot participa la conturarea unor manifestări din tabloul clinic (cum este de exemplu erupţia din rujeolă sau rubeolă). Multe infecţii sînt acompaniate de imunosupresie de intensitate şi durată variabile. Apoi, în cursul infecţiei sau ca o consecinţă a acesteia, se produc mecanisme imunopatologice ce stau la baza unor afecţiuni cu evoluţie cronică, unele din acestea încadrate în bolile autoimune.

Apărarea antivirală are unele particularităţi rezultate mai ales din, proprietatea de parazitism strict celular al virusurilor. În dependenţă de aceasta, factorii de apărare au efecte distincte asupra virusurilor care se găsesc extracelular, ca virioni maturi sau intracelular, în diferitele faze ale multiplicării virale. În stadiul intracelular virusurile sînt protejate faţă de acţiunea majorităţii factorilor de apărare care-şi exercită efectul, mai ales, asupra virionilor prezenţi în spaţiile extracelulare.

În relaţie strînsă cu aceste caracteristici, efectele sînt diferite şi în raport cu modul de răspîndire a virusurilor în organism: *în tipul I*, difuzarea infecţiei se realizează prin trecerea virionilor în spaţiile extracelulare, inclusiv prin viremie şi este carcateristic, mai ales, virusurilor

Scanned with OKEN Scanner

citocide; *în tipul II*, răspîndirea se face prin vecinătate, de la celulă la celulă, fiind caracteristic, în special, virusurilor care se elimină din celulă prin înmugurire; *tipul III* caracterizează virusurile al căror genom poate fi integrat în cromozomul bacterian.

În ansamblu apărarea antiinfecţioasă virală este consecinţa intervenţiei sinergice a factorilor de rezistenţă naturală şi a imunităţii.

4.8.2. REZISTENŢA NATURALĂ

Rezistenţa naturală are trăsăturile generale cunoscute şi, în primul rînd, caracteristica de proprietate genetică de specie. Pentru infecţia virală rezistenţa sau susceptibilitatea sînt controlate în prim plan de absenţa sau prezenţa receptorilor celulari pentru un anumit virus. Cercetările efectuate pe linii înbred de animale au arătat apoi existenţa unei variaţii individuale a rezistenţei în cadrul speciei, susceptibilitatea sau rezistenţa faţă de unele virusuri fiind poligenică, faţă de altele conferită de o singură genă. Pe de altă parte s-a văzut că pentru unele virusuri macrofagele de la animalele rezistente produc o cantitate de virus de 100—1 000 de ori mai mică decît cele ale animalelor susceptibile.

Inhibitorii nespecifici, larg distribuiţi în umori şi ţesuturi, cu constituţie chimică variabilă (proteine, glicoproteine, lipoproteine, polizaharide), unii dintre aceştia termosensibili, alţi termorezistenţi, împiedică ataşarea virusurilor de celulele susceptibile.

Febra ridicată (38°—41°), care însoţeşte majoritatea infecţiilor virale. favorizează procesele de vindecare. Aceasta se datoreşte faptului că cele mai multe virusuri au temperatura optimă de multiplicare în jur de, sau sub 37°. Temperaturile mai mari împiedică sau reduc rata de multiplicare virală. Se adaugă apoi, efectul indirect al febrei, de amplificare a răspunsului imun şi activare metabolică.

Inflamaţia în infecţia virală, spre deosebire de cea bacterian-indusă, se caracterizează prin infiltraţie celulară mononucleară-macrofage şi limfocite. Acest aspect, ca şi observaţiile experimentale, au dus la concluzia că ea este declanşată de procese de IMC, şi în mai mică măsură ca răspuns la necroza celulară.

Fagocitoza are un comportament diferenţiat: polimorfonuclearele sînt lipsite de capacitatea de a distruge virusurile.

Dimpotrivă, pentru unele virusuri pot reprezenta substrate de dezvoltare şi în consecinţă pot servi la difuzarea infecţiei în organism. Sistemul mononuclear fagocitar, prin poziţiile strategice pe care le ocupă în organism şi larga distribuţie în ţesuturi, captează virionii pătrunşi în circulaţia generală şi împiedică astfel generalizarea infecţiei şi accesul spre organul ţintă. Soarta virionilor captaţi este diferită: pentru unele virusuri macrofagul are acţiune virocidă, la altele este împiedicată multiplicarea, iar în sfîrşit unele virusuri pot să folosească macrofagul ca substrat celular de dezvoltare. În această relaţie complexă o importanţă majoră o are cooperarea LT-Mf, cu instalarea posibilă a stadiului de Mf activat, cu posibilităţi crescute de îngrădire a multiplicării virusurilor.

Scanned with OKEN Scanner

Vîrsta. Infecţia virală se întîlneşte ca boală infecţioasă mai frecvent la vîrstele limită — nou-născut şi vîrstele înaintate, deci în situaţii în care organismul are, în general, o rezistenţă scăzută faţă de infecţie.

Condiţii hormonale. Din observaţii clinice şi experimentale a reieşit că hormonii corticosteroizi favorizează infecţia virală, imprimîndu-i o evoluţie mai gravă, şi, mai ales, difuziunea virusurilor în ţesuturi. Graviditatea, probabil prin modificări hormonale, are un efect similar.

Interferenţa virală este o manifestare caracteristică de apărare în infecţia virală. Infecţia unei celule cu un virus, numit *virus interferent*, evită infectarea aceleiaşi celule cu un al doilea virus, numit *interferat*. Fenomenul este similar şi în infectarea organismului animal. În acest sens trebuie privit experimentul prioritar efectuat de Levaditi şi Nicolau (1925), care poate fi atestat ca prima dovadă ştiinţifică pentru intervenţia fenomenului de interferenţă: inocularea iepurilor cu virus vaccinal previne instalarea infecţiei rabice mortale în urma inoculării la aceleaşi animale a virusului rabic. Procesul de interferenţă nu este însă general, existînd posibilitatea ca două virusuri să se multiplice concomitent în aceeaşi celulă (de exemplu, virusul vaccinal şi virusul herpetic, sau virusul poliomielitei şi virusul rujeolei).

Interferenţa virală poate fi explicată prin intervenţia a două categorii de procese:

a. *modificarea suprafeţei şi a metabolismului celulei* prin infecţia cu virus interferent aşa încît ea devine refractară la infecţia cu al doilea virus. Modificările de suprafaţă se datoresc distrugerii, blocării sau alterării conformaţionale a receptorilor, ceea ce împiedică ataşarea virusului interferat. Virusul interferent poate apoi interfera al doilea virus, după pătrunderea în celulă, prin: acţiunea competitivă, pentru un metabolit esenţial sau prin sistemele de replicare, sau prin împiedicarea morfogenezei din constituienţii sintetizaţi de virusul interferat. O manifestare particulară o constituie autointerferenţa prin virioni defectivi;

b. *producerea de interferon* constituie mecanismul cu cea mai largă intervenţie, deci cel mai important, în fenomenul de interferenţă. Interferonii sînt o familie de proteine, mai degrabă glicoproteine, care sînt sintetizaţi în urma acţiunii unor inductori (tabel 4.12) şi, mai ales, a ARN-ului dublu catenar viral din celulele infectate. Sînt o familie de proteine fiindcă apar în tipuri de celule diferite, ca molecule cu proprietăţi fizico-chimice şi funcţii biologice variate, dar cu proprietatea

Tabel 4.12

Principalii inductori ai interferonului

1. ARN dublu catenar viral:
— forme replicative şi forme replicative intermediare
— ARNm viral
2. Polimeri sintetici:
— acid poliriboinosinic — poliribocitidilic /poli(rI)—poli(rC)/
3. Antigene microbiene sau celule microbiene:
— protozoare;
— rickettsii şi Chlamydia;
— endotoxine;
— P.P.D. etc.
4. Mitogeni

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.13

Proprietăţile interferonului

— Greutate moleculară: 20.000 — 40.000	
— Rezistenţă la *p*H acid	
— Sensibilitate la tripsină	
— *Nu au specificitate de virus*	(un interferon indus de un virus are acţiune asupra altor virusuri)
— *Au specificitate de specie*	(un interferon produs de celulele unei specii acţionează, mai ales, la aceeaşi specie, probabil controlat de receptori celulari pentru interferoni)

comună de a inhiba multiplicarea virală. Proprietăţile interferonului se pot vedea în tabelul 4.13. Interferonul are specificitate de specie, înţelegînd prin aceasta că acţionează în organismele sau celulele din aceeaşi specie cu cele în care a fost produs. Este lipsit de specificitate faţă de virus: interferonul indus faţă de un virus are o acţiune antivirală generală. S-a precizat în ultimul timp că, în raport de inductor, celulele producătoare şi proprietăţile biologice, există cel puţin trei tipuri de interferoni: *tipul I convenţional, tipul II imun* şi *tipul III leucocitar* (tabel 4.14).

Tabel 4.14

Tipuri de interferoni

Tipul	Celule producătoare	Inductori	Activitate
Tipul 1 standard (convenţional)	Epiteliale	ARN-dublu catenar	Antivirală
Tipul 2 imun	Limfocite, macrofage	PPD, BCG, endotoxină, mitogeni etc.	Antivirală, imunoreglatoare (pentru imunitatea antivirală)
Tipul 3 leucocitar	Polimorfonucleare	Aceiaşi	Antivirală, activează celulele killer naturale

Toate cele trei tipuri activează celule implicate în IMC care cîştigă capacitate antitumorală.

Biosinteza interferonului este codificată de gene din genomul celular. Acidul nucleic viral sau alţi inductori derepresează genele respective iniţiind sinteza proteinei interferon. În acţiunea interferonului, directă sau indirectă, au fost implicate mecanisme foarte variate, care s-a presupus că interferează cu ataşarea, decapsidarea virionilor, transcrierea sau traducerea informaţiei genetice, sau chiar cu maturarea şi eliminarea virusurilor din celulă. Datele cele mai riguros controlate provin din utilizarea sistemelor de sinteză proteică, obţinută din celule aflate sub acţiunea interferonului. Din aceste experienţe a reieşit că interferonul acţionează prin două modalităţi principale (fără a fi singurele posibile), dependente de acţiunea directă sau indusă de interferon, a ARN dc:

Scanned with OKEN Scanner

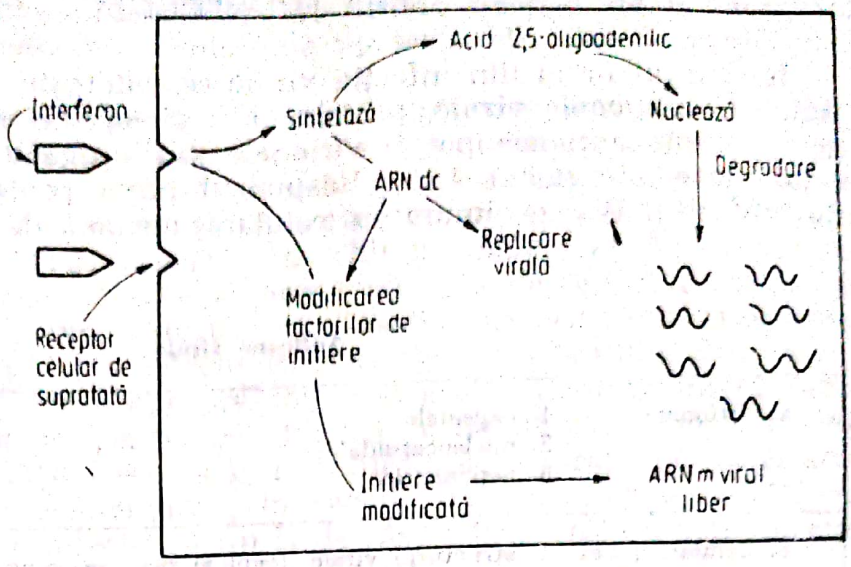


Fig. 4.19. Mecanisme posibile de acțiune a interferonului (ARN dc — ARN dublu catenar); ARN m — ARN m.

a. ARN dc induce sinteza unei enzime care modifică și face inoperante fazele de inițiere a sintezei proteice virale;

b. se induce o enzimă (polimerază) care sintetizează un oligonucleotid-trinucleotid A, cu rol în activitatea unei nucleaze ce degradează m-ARN-ul viral (fig. 4.19). Ambele mecanisme, dovedite experimental, interferează deci cu sinteza proteinelor virale, prin intermediul ARN-m-ului viral, întîlnit atît în infecțiile cu virus ARN, cît și în cele cu virus ARN.

Interferonul în organismul infectat atinge nivelul cel mai înalt la 12—48 ore, după ce virusul infectant ajunge în organism la titrul maxim, iar în cazul interferonului imun, la cîteva ore de la stimularea antigenică. Aceste date arată că interferonul apare înaintea instalării răspunsului imun, avînd un rol important în vindecare. Ținînd seamă de mecanismul de acțiune, se poate aprecia că interferonul are efect maxim în infecțiile cu tipul II de răspîndire.

Prin acțiunea sa antivirală nespecifică, interferonul produs în cursul unei infecții, ca în cazul unei infecții respiratorii, previne pe o perioadă de 2—6 săptămîni îmbolnăvirea cu un alt virus. Aceasta sugerează posibilitatea utilizării interferonului în scopuri preventive. Ținînd seama de cele mai sus s-au făcut ample încercări de introducere a interferonului în terapia și prevenirea infecției virale, inclusiv ca agent terapeutic antitumoral. Pînă acum rezultatele sînt mult sub așteptări. Obținerea unor preparate purificate de interferon în cantitate suficientă pentru aceste scopuri, întîmpină în stadiul actual mari dificultăți. Cu toate acestea, unele sisteme celulare înalt producătoare de interferon s-au arătat promițătoare. Cea mai eficientă cale pare să fie reprezentată însă de producerea interferonului de culturi de *E. coli*, la care au fost introduse prin tehnologia moleculelor recombinate de acizi nucleici, gena producătoare de interferon uman. Preparatele obținute s-au dovedit a fi biologic active. Există deci perspectiva utilizării interferonului în scopuri profilactice sau terapeutice. Cu toate că inducerea interferonului endogen prin polimeri sintetici este limitată în utilizarea la om, datorită toxicității acestora, rămîne posibilitatea obținerii unor polimeri modificați, la care să fie eliminat sau mult atenuat efectul toxic.

Scanned with OKEN Scanner

4.8.3. IMUNITATEA

Răspunsul imun din infecţia virală se datoreşte, în primul rînd, faptului că antigenele virale, proteine sau glicoproteine, sînt bune imunogene. Aceste antigene pot fi virionale sau antigene virale care apar în celula infectată (tabel 4.15). Răspunsul imun poate fi umoral, mediat de limfocitul B şi de imunitate celulară, mediată de limfocitul T.

Tabel 4.15

Antigene virale

a. Virionale	1. capsidale 2. nucleocapsidale 3. peplomerice
b. Celulare (apar în celula infectată)	1. structural virale (peplomerice, se concentrează în membrana celulară) 2. nestructurale — Ag T (celula transformată tumoral) — Ag de transplantare a celulelor tumorale

Răspunsul umoral este asigurat pe de o parte de titre ridicate serice de IgG şi IgM (imunitate generală) şi IgA secretorii, componentă importantă a imunităţii locale la nivelul mucoaselor ce constituie porţi de intrare. Imunitatea generală poate să se instaleze cu un caracter solid, de durată, protejînd organismul faţă de reinfecţie pentru toată viaţa, în infecţiile generalizate. Aceasta se explică prin faptul că astfel de infecţii antrenează în răspuns o mare suprafaţă a sistemului imunitar şi sînt determinate în mod obişnuit de virusuri stabile antigenic, aparţinînd unui singur tip. Efectul Ig se exercită asupra virionului în stadiul extracelular, de aceea intervenţia lor are eficienţă în special, în infecţiile a căror răspîndire este de tip I, cu efect maxim în faza de viremie, împiedecînd accesul virusului spre organul ţintă. În stadiul intracelular al virusurilor, anticorpii sînt în mare măsură lipsiţi de efect. IgA secretorii, prin imunitatea locală pe care o realizează, asigură apărarea, în primul rînd în infecţiile localizate la poarta de intrare (infecţii ale căror organe ţintă se suprapun cu poarta de intrare). Totodată ele pot împiedica evoluţia infecţiilor generalizate din stadiul iniţial de instalare la poarta de intrare. Din aceste considerente, imunitatea locală şi IgA secretorii au o importanţă majoră în apărarea antivirală.

Mecanismul de acţiune al anticorpilor este complex. În primul rînd, prin formarea complexelor antigen-anticorp pe suprafaţa vironului se produce neutralizarea virusului. Aceasta se datoreşte faptului că Ig pot bloca poziţiile de ataşare pentru receptorii celulari, împiedicînd pătrunderea virusului în celulă. Prin procesul de opsonizare este favorizată fagocitarea de către macrofage. De asemenea, virionii pe care s-au legat anticorpii sînt mai uşor degradaţi după pătrunderea în aceste celule. Ig fixate pe virioni activează sistemul complement, putînd duce la virionoliză, sau amplifică procesul de neutralizare. În cazul în care anticorpii se fixează pe celulele modificate antigenic, prin activarea C' se produce liza celulară, împiedecîndu-se multiplicarea virală. Instalarea imunităţii umorale are rol de apărare, contribuind la vindecarea

Scanned with OKEN Scanner

din infecție și prevenind reinfecția. În ultima situație, de la începutul reinfecției se instalează un răspuns de tip secundar, care împiedică manifestările morbide.

Imunitatea mediată celular. Informații prețioase privind rolul IMC în apărarea antivirală au fost aduse de așa-numitele „experiențe ale naturii". Este vorba de copii cu defecte genetice înăscute, care duc la agamaglobulinemii. S-a observat că astfel de subiecți fac infecții bacteriene repetate cu evoluție gravă. În schimb, vindecarea din multe infecții virale nu este în măsură evidentă afectată de defectul imunității umorale, iar trecerea prin infecție este însoțită de cîștigarea rezistenței la reinfecție. La copiii cu defecte funcționale ale timusului, multe infecții virale au însă o evoluție prelungită și gravă. Comportament similar s-a găsit la linii de șoareci genetic lipsite de timus (animale nude). S-a văzut apoi că, după trecerea prin multe infecții virale, la om și animale, IMC poate fi evidențiată prin reacții HT. Mecanismele IMC au intervenție majoră în infecții cu tip II de răspîndire, deci cu acțiune mai ales, asupra virusurilor în poziții endocelulare.

Mecanismele prin care intervin efectorii IMC sînt încă insuficient cunoscute. Datele existente însă permit următoarele generalizări: față de celulele care au în suprafața lor antigene virale, LT își exercită efectul direct citotoxic, prin distrugerea celulară, eliminîndu-se componentele virale înainte de morfogeneza virionilor:

— în exercitarea aceluiași efect citotoxic, LT activează macrofagul care cîștigă capacitatea crescută de distrucție intracelulară a virionilor fagocitați;

— prin limfochine se inițiază inflamația din infecția virală, în focarul inflamator concentrîndu-se factorii celulari și ceilalți factori (imunitari și de rezistență naturală), care participă în apărare, angajîndu-se totodată sistemul imunitar în răspunsul imun;

— la acestea se adaugă rolul subpopulațiilor reglatoare ale LT în modularea răspunsului imun.

Reunind posibilitățile de apărare antivirală descrise anterior, se poate ajunge la concluzia că, dacă factorii de rezistență naturală și cei imunitari intervin cu o acțiune echilibrată, efectul biologic este favorabil, ducînd la vindecarea dintr-o infecție sau la prevenirea instalării ei. Dacă în această acțiune cooperativă se produc dezechilibrări, se pot instala efecte biologice nefavorabile: procese imunopatologice. Unele din acestea pot contribui la conturarea manifestărilor morbide din cursul infecției: erupția cutanată din rujeolă, rubeolă, leziunile din encefalita postrujeoloasă ș.a. Episodul acut al infecției poate fi urmat de instalarea unor afecțiuni cu evoluție cronică în a căror patogeneză intervin mecanisme imune: hepatita cronică evolutivă, glomeluronefrite prin complexe imune ș.a. Se apreciază că și alte boli din categoria celor autoimune ar putea avea o patogeneză asemănătoare. Unele infecții sînt acompaniate de stări de imunosupresie diferite ca nivel și durată. Este bine cunoscută așa-zisa anergie după rujeolă: subiecți care înainte de infecție au IDR la tuberculină pozitivă, după trecerea prin boală, se negativează pe o perioadă tranzitorie.

Situații similare au fost semnalate și în alte infecții, ca de exemplu, gripa, sau în boli tumorale ale sistemului limfatic, probabil de origine virală. În infecția virală experimentală la animal, procesul de imunosupresie indus de virusurile oncogene sau alte virusuri este bine caracterizat.

Scanned with OKEN Scanner

4.8.4. IMUNOPROFILAXIA INFECȚIEI VIRALE

De la utilizarea în 1798 de către E. Jenner a virusului vaccinal în imunizarea față de variolă, vaccinarea, ca metodă de profilaxie a infecției virale, a avut succese remarcabile. Este suficient să amintim că medicina profilactică a ajuns la cea mai mare cucerire în apărarea sănătății omului, realizînd programul, care are la bază vaccinarea antivariolică, de eliminare definitivă de pe întreg globul a variolei. Pentru dezvoltarea profilaxiei prin vaccinare, un rol hotărîtor l-a avut obținerea de către Pasteur a vaccinului antirabic (1885). Făcînd o apreciere generală asupra vaccinurilor, se constată că s-au dovedit eficiente cele utilizate în infecțiile generalizate, avînd ca agent etiologic, mai ales, virusuri cu un singur tip, sau puține tipuri antigenice. Față de infecțiile localizate pe mucoasele porților de intrare, rezultatele obținute pînă în prezent sînt puțin promițătoare.

Vaccinurile folosite sînt preparate fie din *virusuri inactivate*, mai corect spus din virioni omorîți prin căldură sau mai frecvent prin substanțe chimice (fenol, formol, beta-propiolactonă), fie din *componente ale virionului* (de exemplu, hemaglutinina) sau din *virusuri vii cu virulență diminuată*, atenuată (mutante ale virusului sălbatic).

Vaccinurile cu virusuri inactivate au avantajul de a fi stabile, virionii fiind omorîți și pot fi supuse unui control al inocuității mai ușor de realizat. Dezavantajele prezentate în tabelul 4.16 limitează încă utilizarea lor. Din această categorie reținem atenția: *vaccinul rabic* (virus omorît cu fenol — vaccin Fermi sau cel utilizat în ultima vreme, virus omorît cu beta-propiolactonă); *vaccinul gripal*, virusuri reprezentînd variantele în circulație inactivate cu formaldehidă; *vaccinul poliomielitic Salck*, preparat din cele trei tipuri antigenice de virus polio omorît cu formaldehidă.

O cale de perspectivă este prepararea vaccinurilor din componente virale cu rol major în inducerea răspunsului imun: capsidă, peplomeri din învelișul viral. Astfel, unul din vaccinurile gripale este preparat din hemaglutinină purificată, produs de Institutul „I. Cantacuzino" și este principalul tip de vaccin folosit în profilaxia gripei la noi în țară.

Tabel 4.16

Avantajele și dezavantajele vaccinurilor cu virusuri vii și virioni inactivați

Avantaje	Dezavantaje
Virusuri vii cu virulență atenuată	
O singură doză sau puține doze sînt suficiente pentru obținerea unui răspuns imun eficace.	Reversie la virulență.
Posibilitatea eliminării din circulație a virusurilor sălbatice.	Răspîndire naturală la contacți.
	Posibilitatea de a conține virusuri contaminante.
	Interferența virală.
Virioni inactivați	
Stabilitate mare.	Doze multiple la imunizarea primară și rapel.
Controlul inocuității ușor de efectuat.	Sînt reactogeni.
	Nu se dezvoltă imunitate locală.
	Sînt necesare cantități mari de antigen (sînt costisitoare).

Scanned with OKEN Scanner

Vaccinurile cu virusuri vii cu virulenţă atenuată sînt principalele vaccinuri utilizate. Aceasta datorită faptului că răspunsul imun indus are aceleaşi mecanisme ca cele întîlnite în infecţia naturală. Virusurile din vaccin sînt mutante a căror virulenţă a diminuat prin pasaje succesive pe sisteme adecvate de cultivare, multe din acestea fiind de tipul mutantelor „adaptate la rece" sau a mutantelor ts. Cu toate că au unele dezavantaje, avantajele prezentate în tabelul 4.16 fac ca aceste vaccinuri să fie mult folosite. Între vaccinurile din această categorie pot fi amintite: vaccinuri care se utilizează la noi în ţară — *vaccinul variolic cu virus vaccinal; vaccinul poliomielitic,* preparat din tulpinile Sabin, mutante lipsite de neurotropism ale celor trei tipuri de virus polio; *vaccinul gripal* — variante de virus gripal cu virulenţă diminuată obţinute de Smorodinţev în URSS, folosit şi la noi în ţară, prin inoculare intranazală, sau vaccinuri preparate din mutante ts., în curs de experimentare; *vaccinul amaril* împotriva febrei galbene, obligatoriu pentru cei care călătoresc în zone endemice pentru această infecţie; *vaccinul antirujeolos,* preparat din tulpina supraatenuată Edmonston-Schwartz. Toate aceste vaccinuri sînt obligatorii. S-au dovedit eficiente *vaccinul rubeolos* (Cendehill), *vaccinul urlian,* iar la animale *vaccinul rabic* preparat din tulpina atenuată Floury.

Rămîn încă infecţii majore ale omului în care nu s-a reuşit realizarea unui control eficient prin vaccinare: hepatite, enterite virale, infecţii respiratorii etc. Dezvoltarea geneticii virale constituie o bază ce oferă posibilităţi multiple de obţinere de noi vaccinuri eficiente, între care mutantele ts par să fie, în primul rînd, promiţătoare.

Seroprofilaxia

Inducerea unei imunităţi pasive prin administrare de ser are o utilizare limitată. B a b e ş a preconizat în 1889 asocierea administrării de ser antirabic cu vaccin în prevenirea infecţiei la cei cu plăgi profunde ale extremităţii cefalice, motiv pentru care trebuie considerat întemeietorul seroterapiei. Metoda a fost reluată cu succes în ultimii ani. Deoarece prin serul uman se pot transmite hepatitele virale, utilizarea acestuia a fost înlocuită cu preparate concentrate de anticorpi — gamaglobuline. Astfel, gamaglobulinele pot fi folosite în profilaxia hepatitei A, rabiei, rujeolei, rubeolei, oreionului etc. În ultimul timp s-au obţinut gamaglobuline hiperimune, din serul indivizilor imunizaţi, cum sînt: *gamaglobulina antirabică, antiherpetică, antirujeoloasă, antihepatită* B etc.

4.8.5. CHIMIOTERAPIA ŞI CHIMIOPROFILAXIA ÎN INFECŢIILE VIRALE

Similar chimioterapiei antibacteriene, s-a dezvoltat un domeniu important de cercetare în scopul sintezei şi testării experimentale sau clinice a unor substanţe cu acţiune antivirală. Cu toate că au fost antrenate colective largi de cercetători, rezultatele sînt mult sub aşteptări. Aceasta se datoreşte, în primul rînd, cerinţei impuse unui chimioterapic antiviral, acţiune toxică selectivă. Pentru virusuri, acest deziderat este greu de realizat, datorită faptului că un chimioterapic eficient trebuie să aibă ca mecanism de acţiune inhibarea replicării virale. Deoarece aceasta se realizează prin procese moleculare genetice, similare cu

Scanned with OKEN Scanner

cele ale celulelor în care are loc replicarea virală, este dificil de selectat agenţii care să interfereze specific cu mecanismele proprii ale multiplicării virale. Pe alt plan, este însă adevărat că un chimioterapic poate inhiba oricare din fazele principale ale multiplicării, de la ataşare de celula sensibilă pînă la asamblarea şi eliminarea virionilor din celulă. În acest sens s-au şi găsit chimioterapice care au ca ţintă una din fazele multiplicării. O astfel de acţiune precis ţintită are însă o limitare a efectului pentru o familie sau puţine familii de virusuri, aşa cum sînt chimioterapicele antiherpetice. Se postulează de aceea că un bun chimioterapic trebuie să acţioneze similar cu factorii de apărare naturală, şi în primul rînd, cu interferonul, blocînd selectiv sinteza proteinelor virale.

În stadiul actual, chimioterapia antivirală are, mai ales, o dezvoltare experimentală, folosind în acest scop sistemele biologice de cultivare a virusurilor. Pe această cale s-a ajuns la o concluzie cu caracter general: faţă de multe, dacă nu de toate chimioterapicele, se dezvoltă variante (mutante) rezistente, cu o frecvenţă diferită în raport de chimioterapie. Alături de necesitatea unei toxicităţi selective, aceasta constituie una din *limitările* importante ale dezvoltării chimioterapiei antivirale.

În prezent se cunoaşte că două chimioterapice şi-au dovedit eficienţa după o testare riguroasă experimentală şi clinico-epidemiologică:

1. Marboranul (N-metilizatin — β-tiosemicarbazonă) cu acţiune specifică faţă de poxvirusuri, în principal asupra virusului variolei, cu eficienţă în primul rînd, profilactică, dar şi terapeutică; 2. Amantadina

Tabel 4.17

Substanţe utilizate experimental în chimioterapia şi chimioprofilaxia infecţiilor virale

Chimioterapicul	Mecanisme de acţiune	Virusuri interesate
Methisazona (Marboran) (N-metilizatin-β-tiosemicarbazonă)	Inhibă specific replicarea poxvirusurilor şi sinteza proteinelor virale	V. variolei (inclusiv la om)
Amantadina (Symmetrel) (amină sintetică)	Blochează penetrarea şi decapsidarea	M. influenzae tip A (inclusiv la om)
Idoxuridina (IUDR) (5-iodo-2′-deoxiuridina)	Analog al timidinei, inhibă replicarea ADN	Herpesvirus simplex (aplicaţii locale în cheratita herpetică)
Trifluorotimidina (5-trifluorometil-2′-deoxiuridina)	Analog al timidinei, inhibă replicarea ADN	Herpesvirus simplex (aplicaţii locale în cheratita herpetică)
Ara-A, Adenin arabinozid, Vira-A (9-β-D-arabinofuranozil-adenină)	Inhibă ADN-polimeraza	Herpesvirus simplex (infecţii generalizate, encefalite)
Aciclоguanozina (9-/2-hidroxietoximetil/guanină)	Analog al deoxiguanozinei	Acţiune selectivă asupra v. herpes simplex
Acidul fosfonoacetic	Inhibă specific ADN-polimeraza	Herpesvirus simplex (utilizare limitată datorită frecvenţei mari a mutantelor rezistente)
Virazol (Ribavirin) (1-β-D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-carboxamidă)	Inhibă sinteza guanozin-5′-fosfatului	Virusuri cu ADN şi ARN (în studiu)
2-Deoxi-D-glucoză	Interferează cu sinteza glicoproteinelor şi glicolipidelor virale	Herpes cutanat şi al mucoaselor

Scanned with OKEN Scanner

(Symmetrel), o amină sintetică, care inhibă multiplicarea virusurilor gripale A, prin blocarea penetrării în celulă și care are efect profilactic.

În afară de acestea, așa cum se vede în tabelul 4.17, cele mai multe chimioterapice s-au arătat active, mai ales în aplicațiile locale, față de infecțiile cu virusul herpes simplex, multe dintre acestea fiind analoage nucleotidelor ce intră în sinteza ADN. Astfel se explică limitarea la aplicarea locală, mai ales, în keratoconjunctivita herpetică.

4.9. FAMILIA POXVIRIDAE. VARIOLA ȘI VIRUSUL VACCINAL

Denumirea familiei derivă de la cuvîntul englezesc „*pox*" dat leziunilor veziculare caracteristice din variolă și unele infecții animale (variola bovinelor). Numeroasele virusuri ale familiei, prezente la mamifere, păsări și insecte, au fost încadrate în 6 genuri. Cele mai importante pentru patologia umană sînt: *virusul variolei și vaccinei (Orthopoxvirus); virusul nodulilor lăptarilor și al dermatitei pustuloase orf (Parapoxvirus) și virusul ce produce molluscum contagiosum,* încă neîncadrat în genurile existente. Ținînd cont de faptul că în urma programului organizat și realizat de OMS variola este eradicată, studiul acestor infecții are doar importanță istorică. Virusul variolic și cel vaccinal rămîn însă modele de cunoaștere a familiei.

Sînt virusuri cu ADN dublu catenar, de formă prismatică (cărămidă), mari (350 × 250 × 150 nm). Sînt constituite dintr-un înveliș exterior lipoproteic de informare virală, care înconjoară doi corpi laterali proteici și sîmburele (core) reprezentat de ADN. Sîmburele conține o ARN-polimerază, ADN dependentă și alte enzime. Au fost descrise peste 20 antigene (structurale, solubile), majoritatea specifice de grup, precum și o hemaglutinină (aglutinează hematiile de găină).

Sînt virusuri cu multiplicare citoplasmatică, în zone denumite „uzine de virus", unde se pot constitui incluzii eozinofile caracteristice (corpi Guarnieri).

După pătrunderea virusului prin mucoasele tractului respirator, urmează multiplicarea în țesutul limfatic regional. Are loc apoi prima viremie, tranzitorie, multiplicarea în SRE, a doua viremie și localizarea la organele țintă (tegumente), cu manifestările caracteristice. Erupția cutanată, cu stadii succesive (maculă, papulă, veziculă, pustulă, crustă, cicatrice), este consecința localizării și multiplicării virusului în epiderm. Forma clinică obișnuită, cu evoluție gravă și mortalitate ridicată (peste 15%), a fost *variola major;* s-au descris și forme ușoare, *variola minor* (alastrimul). În urma infecției se realizează o imunitate de lungă durată prin mecanisme umorale și mediate celular.

Pornind de la metoda variolizării, aplicată cu secole în urmă, J e n n e r (1789—1796) a realizat vaccinarea cu agentul infecțios al variolei vacilor, înrudit antigenic cu cel variolic. S-a trecut apoi la prepararea de vaccin din limfa leziunilor tegumentare produse prin inocularea virusului vaccinal la viței. Vaccinarea și revaccinarea antivariolică s-au aplicat în toată lumea. După scarificarea pielii din regiunea deltoidiană, se depune o picătură de vaccin; evoluția leziunilor este asemănătoare celor din

Scanned with OKEN Scanner

variolă, în final cu o cicatrice persistentă. În etapa actuală unele țări au renunțat la vaccinarea obligatorie.

Dintre alte boli umane produse de poxvirusuri, sînt de reținut în mod deosebit:

— *dermatita pustuloasă orf* evoluează la oi, de la care se poate transmite omului. Apar erupții veziculo-papuloase pe mîini sau față, care pot evolua spre noduli însoțiți de adenopatie regională. Este o boală profesională;

— *boala nodulilor lăptarilor*, prezentă la bovine, se transmite omului prin contact. Leziunile umane, asemănătoare celor din dermatita pustuloasă, se pot vindeca în 4—8 săptămîni;

— *molluscum contagiosum*, infecție specific umană, se datorește pătrunderii virusului prin tegumentele lezate ca urmare a contactului direct. Apar noduli epidermici, ombilicați, însoțiți de noduli sateliți la periferia leziunilor primare. După cîteva luni dispar fără tratament.

4.10. ADENOVIRIDAE

Cuprind două genuri: ***Mastadenovirus***, care infectează mamiferele (om, maimuță, cîine, șoarece, bovine) și *Aviadenovirus*, prezent la păsări.

Proprietăți generale. Sînt virusuri cu ADN dublu catenar, simetrie cubică, neînvelite. Virionul, cu diametrul de 70—90 nm, este un icosaedru cu capsida alcătuită din 252 capsomere. Dintre acestea, 240 sînt capsomere hexonice, celelalte 12, situate la vîrfurile icosaedrului, fiind capsomere pentonice. Pentonii se continuă cu o „fibră", terminată printr-o îngroșare, ca o măciucă (fig. 4.20). Proteinele bogate în arginină sînt asociate cu ADN, formînd sîmburele (core) virional. Lipsa învelișului lipidic conferă rezistență la solvenții organici și la sărurile biliare, explicînd supraviețuirea adenovirusurilor în tractul intestinal și frecventa izolare din materiile fecale.

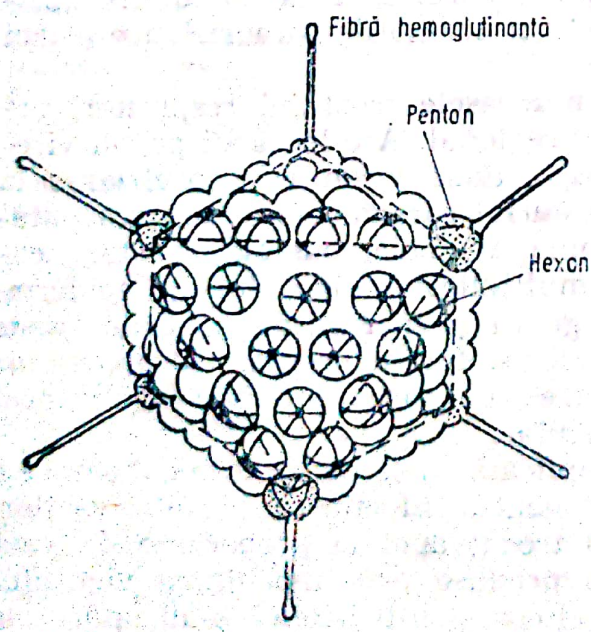


Fig. 4.20. Schema unui virion de Adeno-virus.

Există 34 tipuri antigenice umane, diferențiate prin seroneutralizare și hemaglutinoinhibare. Tulpinile izolate de la mamifere au un antigen fixator de complement comun, diferit de antigenul corespunzător prezent la adenovirusurile aviare. Au fost descrise 4 antigene adenovirale: A, B, C, P (tabel 4.18).

O activitate toxică este asociată cu antigenul B, determinînd desprinderea culturilor de celule infectate, de pe peretele tubului. Antigenul fibrei este implicat în capacitatea hemaglutinantă a adenovirusurilor. Pe baza proprietății de a aglutina hematii de șobolan sau maimuță

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.18

Antigene adenovirale

Tip	Corespondent structural	Specificitate
A	hexoni	— de grup (evidenţiată prin rfc, difuzie în gel) — de tip (evidenţiată prin seroneutralizare)
B	baza capsomerului pentonic	— de subgrup
C	fibra	— de tip (conferă proprietatea hemaglutinantă)
P	core	

Tabel 4.19

Subgrupe de adenovirusuri

Subgrup	Aglutinează hematii de			Tipuri
	maimuţă Rhesus		şobolan	
1	+		—	3, 7, 11, 14, 16, 20, 21, 25, 28
2	—		+	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23,
	(sau slab +)			24, 26, 27, 29, 30.
3	—		± (numai în anumite condiţii)	1, 2, 4, 5, 6, 12*, 18*, 31*

* nu aglutinează nici un fel de hematii. Sînt totodată tipuri oncogene

Rhesus au fost separate trei subgrupe de adenovirusuri, care se deosebesc şi prin alte proprietăţi (tabel 4.19).

Adenovirusurile umane se cultivă în culturi primare de rinichi embrionar uman şi în linii celulare umane (HeLa, Kb, Hep-2). Dezvoltarea este lentă, inducînd ecp cu rotunjirea celulelor, agregarea lor în ciorchine şi desprinderea de pe peretele tubului. Pe preparate colorate se pot observa incluzii nucleare, legate de periferia nucleului prin fire de cromatină (aspect de rozetă), cu menţinerea intactă a nucleolului. Replicarea ADN viral şi asamblarea componentelor virale au loc în nucleul celulei gazdă.

Adenovirusurile sînt, în general, lipsite de patogenitate pentru animalele obişnuite de laborator, dar unele tipuri, îndeosebi 12, 18, 31 produc tumori maligne la hamsteri şi şobolani nou născuţi, constituind modele de studiu pentru oncogeneza virală.

Infecţii umane. Adenovirusurile umane au fost iniţial izolate din culturi de celule adenoidiene. Sînt capabile să persiste în stare latentă în ţesutul limfoid fără simptome aparente. Alteori sînt responsabile de boli febrile cu simptome respiratorii şi conjunctivale, care apar sporadic sau sub formă de epidemii, îndeosebi în colectivităţi. Infecţiile adenovirale sînt cuprinse în tabelul 4.20.

Se apreciază că 5—10% din îmbolnăvirile respiratorii virale sînt cauzate de adenovirusuri. Pneumoniile şi infecţiile respiratorii superioare adenovirale sînt semnalate ca izbucniri epidemice, la recruţi. Deşi

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.20

Infecții adenovirale

Îmbolnăvire	Manifestare	Tipuri frecvent incriminate
Faringită acută febrilă	Faringită uscată, tuse, febră	3, 1, 2, 5
Febră faringo-conjunctivală	Febră, faringită, conjunctivită, adenopatie cervicală	3, 7, 14, 4, 21
Conjunctivită acută foliculară	Conjunctivită nepurulentă, uni-, sau bilaterală, adenopatie preauriculară	3, 7, 4, 14, 1, 2
Keratoconjunctivită epidemică	Favorizată de mici traume corneene și conjunctivale, cauzate de pulberi agricole sau industriale	8 (rar 19)
Boli respiratorii acute superioare	Febră, catar, tuse, faringită	3, 7, 4, 14
Pneumonie	La copii și adulți	3, 4, 7
Adenite mezenterice	Asemănătoare apendicitei la copii	1, 2, 3, 5, 6
Cistite hemoragice	La copii	11, 21

se izolează frecvent din fecale, rolul adenovirusurilor în infecțiile intestinale nu este precizat.

După trecerea prin boală apar anticorpi specifici, seroneutralizanți, cu rol protector și anticorpi fixatori de complement, a căror identificare permite diagnosticul serologic.

4.11. HERPETOVIRIDAE

Cuprinzînd peste 25 membrii, familia *Herpetoviridae* nu are un antigen comun de grup (tabel 4.21). Ea cuprinde virusuri mari, cu o biologie

Tabel 4.21

Familia Herpetoviridae

A. Proprietăți :	
Virion sferic, diametru 150—260 nm	
Capsidă icosaedrică, diametru 100 nm, 162 capsomere	
Învelișuri multiple	
ADN dublu catenar, greutate moleculară 100—150 × 10^6 daltoni	
Multiplicare intranucleară	
B. Principalele virusuri (sînt denumite virusurile umane):	
Alphaherpesvirinae	
v. herpes simplex	2 tipuri
v. varicelă-zona zoster	1 tip
virusuri la animale	>7 tipuri
Betaherpesvirinae	
Citomegalovirus	1 tip
virusuri (ale glandelor salivare) la animale	>4 tipuri
Gammaherpesvirinae	
v. Epstein—Barr	1 tip
virusuri la animale	>5 tipuri

Scanned with OKEN Scanner

complexă, adaptate speciilor animale pe care le infectează în mod natural. Infectarea accidentală umană duce la îmbolnăviri grave (de exemplu, encefalita cu virus herpes B de la maimuță). Virusurile care infectează omul sînt: v. herpes simplex, cu tipurile antigenice 1 și 2 (HS), v. varicelă-zoster (VZ), v. citomegaliei cu incluzii (CM) și v. Epstein-Barr (EB) al mononucleozei infecțioase. Ele au tendința de a stabili infecții persistente în pofida prezenței anticorpilor serici, unele pentru toată viața (HS, VZ), celelalte dacă nu pe viață, cel puțin cîțiva ani (CM, EB). Primoinfecția poate trece neobservată; persistența virusurilor în organism duce la reactivări, cu episoade clinice. Cu excepția v. EB celelalte se multiplică în celule diploide umane, iar v. HS poate fi cultivat pe o largă gamă de gazde de laborator. Se pare apoi că rezistența față de îmbolnăvire sau reîmbolnăvire este legată, mai ales, de imunitatea mediată celular, aceste virusuri putîndu-se transmite intercelular prin contiguitate, la adăpost de anticorpii extracelulari.

4.11.1. HERPES SIMPLEX

Se cunosc două tipuri de virus herpes simplex, cu multiple proprietăți asemănătoare: *tipul 1 („oral")* și *tipul 2 („genital")*, care sînt destul de greu de deosebit în practica diagnosticului de laborator. Virusul se poate multiplica în culturi primare sau linii celulare umane, în oul embrionat, la șoarecele nou-născut, cobai, hamster, iepure.

Îmbolnăvirile îmbracă o varietate de forme clinice, de la erupții veziculare localizate pe tegumente sau mucoase, în general cu gravitate redusă, la encefalite sau herpes generalizat, cu mortalitate mare. Primoinfecția, de obicei inaparentă, este urmată de cantonarea virusurilor în ganglionii rahidieni corespunzători ariei cutanate sau mucoase infectate; recidivele apar ca buchet de vezicule pe fond eritematos în aceeași zonă cutanată sau mucoasă, virusul ajungînd aici pe calea filetelor nervoase. Se cunosc factori declanșatori ai recidivelor ca frig și căldură excesive, ultraviolete (insolație), reacții de hipersensibilitate, factori hormonali, unele boli febrile și altele, fără a se putea explica mecanismul de acțiune. Unele îmbolnăviri apar numai ca primoinfecție (pi), altele ca infecții primare sau reactivări (re), cu unul sau altul din cele două tipuri, cele mai importante fiind prezentate în tabelul 4.22.

O situație specială o prezintă infecția herpetică la gravide. Dacă este o primoinfecție cu tip 1 sau 2, infecția transplacentară poate duce la malformații congenitale sau herpes congenital diseminat (generalizat), cu leziuni, mai ales, în ficat și creier, mortalitate mare sau sechele grave. Herpes congenital se poate produce și în cazul unei recidive cu tipul 2, virusul fiind transmis la nou-născut din leziunile cervicale sau vaginale, în timpul nașterii.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.22

Boli produse de Herpetoviridae

Virus		Boală	
		Obişnuit	Rar
Herpes simplex	tip 1	Gingivostomatită (pi)* Faringită, amigdalită (pi) Herpes labial (re) Keratoconjunctivită (pi, re)	Eczema herpeticum (pi) Herpes traumatic (re) Meningoencefalită, mai ales la adult (pi, re)
	tip 2	Herpes genital (pi, re)	Herpes neonatal (pi), adesea cu meningoencefalită
Varicelă-zoster		Varicelă Zona-zoster	Pneumonie Encefalită
Citomegalovirus		Citomegalia cu incluzii	Mononucleoză posttransfuzională Hepatită Pneumonie
v. Epstein—Barr		Mononucleoză infecţioasă Limfom Burkitt Carcinom nazo-faringian	Mononucleoză posttransfuzională Sindrom Guillain—Barré Paralizie facială, mielită transversă

* pi — primoinfecţie; re — recidivă.

4.11.2. VARICELA — ZONA ZOSTER

Virusul VZ produce două boli, în funcţie de răspunsul gazdei: *varicelă* la primoinfecţie, boală contagioasă a copilăriei, urmată de persistenţa virusului în organism (asemănător virusului herpetic) şi *zona zoster*, boală sporadică, consecinţă a reactivării virusului într-o gazdă parţial imună, aproape totdeauna adult. Un bolnav de zona zoster poate declanşa la copii fără imunitate o epidemie de varicelă.

Varicela — una dintre cele mai contagioase boli, întîlnită mai ales, între 2—6 ani, este caracterizată prin erupţie veziculară generalizată, cu leziuni în diverse stadii de evoluţie. La baza leziunii se găsesc celule gigante, multinucleate, cu incluzii intranucleare, evidenţiabile într-un frotiu colorat Giemsa; celule asemănătoare se găsesc în leziunile de zona zoster şi herpetice (evidenţierea lor constituie testul Tzanck). Vindecarea se face fără cicatrice. Complicaţiile sînt rare, deşi encefalita şi pneumonia variceloasă au o evoluţie gravă. Destul de frecvent însă poate apare o infecţie bacteriană secundară (stafilococ, streptococ).

Varicela la adult are o evoluţie mai severă — erupţie mai intensă, mai frecvent leziuni hemoragice sau buloase; incidenţa pneumoniei pînă la 20—30% din cazuri.

Zona zoster evoluează cu leziuni asemănătoare, localizate însă pe traiectul unui nerv senzitiv (intercostal, ramură de trigemen etc.) şi însoţite de durere puternică; eventual pleiocitoză limfocitară în ler, paralizii prin prinderea nervului motor corespunzător.

Scanned with OKEN Scanner

Varicela, zona zoster și herpesul tind să evolueze mult mai grav la persoane a căror răspuns imun este diminuat — fie ca deficit natural, mai ales, a imunității celulare, fie ca urmare a unui tratament cu corticosteroizi, citostatice, imunosupresoare majore. Deși ele pot fi diagnosticate clinic, există situații în care numai laboratorul poate preciza etiologia.

4.11.3. CITOMEGALIA CU INCLUZII

Virusurile citomegalice sînt larg răspîndite în lumea animală, avînd o marcată specificitate, de specie (cunoscute și ca virusuri ale glandelor salivare la maimuță, cobai, hamster, șobolan etc.). Virusul citomegalic uman se poate dezvolta în orice țesut din organism, deși *in vitro* nu este cultivabil decît în fibroblaste. Se cunosc mai multe serotipuri și variante antigenice intermediare, toate avînd și un antigen comun fixator de complement. Descrierea unei boli grave a nou-născutului, caracterizată prin prezența, mai ales, în ficat, rinichi, plămîn, a unor celule mari (25—40 um), cu nucleu mărit cuprinzînd o incluzie caracteristică rotundă, separată printr-un halo de membrana nucleară, a creat impresia că citomegalia cu incluzii este o infecție rară și fatală. Izolarea virusului (1956) și tehnicile serologice subsecvente au arătat că ne aflăm în fața unui virus care prezintă caracterele grupului Herpes. Există mai multe posibilități de transmitere: salivară, urinară (virurie la bolnavi sau sănătoși), veneriană, transplacentară; (virusul este prezent în lichidul amniotic) transmiterea fiind prezentă în unele zone geografice pînă la 1—2% din sarcini. Apoi intrapartum — virusul este prezent în colul uterin în trimestrul al treilea de sarcină la 3—10% din femei (unele regiuni pînă la 30%), copiii astfel infectați eliminînd urinar virusul, de obicei însă fără a face o formă clinică de boală. Termenul de citomegalie cu incluzii (CMI) se păstrează pentru boala care apare la unii din copiii infectați transplacentar, în general, ca urmare a unei primoinfecții la mamă. Există forme diferite ca gravitate, cu supraviețuire de la cîteva săptămîni sau luni la cîțiva ani. Virusul este prezent în diverse țesuturi și eliminat ani de zile prin urină, salivă etc. Infecția inaparentă în copilărie este obișnuită și în general limitată la glandele salivare și rinichi, cu eliminare salivară și urinară. Între 2—10 ani, 5—10% din copii (la cei care trăiesc în colectivități pînă la 40%) elimină virusul prin urină sau se poate izola din amigdale. La adult este posibilă o viremie, legată, mai ales, de leucocite; fără semne de boală virusul a fost găsit la 5% din donatorii sănătoși; am văzut mai sus prezența virusului pe măsura progresiei sarcinii. Sînt ocazionate astfel cîteva tipuri de îmbolnăviri:

1. „mononucleoza post-transfuzională", fără anticorpi heterofili (v. EB), eventual o hepatită ușoară; chiar în absența acestor boli clinice, peste 50% din politransfuzații sau perfuzații seronegativi (fără anticorpi) prezintă semne de infecție cu v. CM și pot elimina virus;
2. infectarea a aproximativ 90% din cei cu transplante, fie din transplant, fie ca reactivare din cauza imunosupresiei;
3. pneumonie interstițială, cu leziuni și în alte organe, în diferite situații de scădere a reactivității imunologice (deficit imunologic înnăscut, tratament imunosupresor, boli maligne).

4.11.4. VIRUSUL EPSTEIN—BARR (v. EB) ŞI MONONUCLEOZA INFECŢIOASĂ

Virusul, descoperit în 1964 de Epstein, Achong şi Barr în limfoblaste din limfomul Burkitt, este un herpetovirus uman limfotrop. Celula ţintă pe care o infectează este limfocitul B uman şi se poate multiplica în limfocitele unor maimuţe inferioare (marmoset). Receptorii virali par să fie identici sau strîns asociaţi cu receptorii pentru complement. Majoritatea celulelor sînt infectate abortiv şi numai un procent redus sau foarte redus conţin virus infecţios. De aceea prezenţa virusului se detectează prin proprietăţile limfocitelor infectate:

a. transformarea lor în linii limfoblastoide (care se pot multiplica *in vitro*, spre deosebire de limfocitele normale);

b. evidenţierea unor antigene induse viral (antigenul nuclear —EBNA este prezent în toate celulele infectate, indiferent de producerea de virus).

În fiecare celulă există în nucleu mai multe copii ale ADN v.EB fie integrate în cromozom, fie libere, circulare, analoage plasmidelor bacteriene. Virusul infectează încă din copilărie, în majoritatea cazurilor inaparent, astfel că 60—70% din tineri şi 80—90% din adulţi au anticorpi antivirali. Boala comună pe care o produce v.EB este mononucleoza infecţioasă. În afară de aceasta, virusul a fost incriminat ca agent etiologic în proliferări tumorale — limfom Burkitt şi carcinom nazofaringian, boli pentru care există probabil şi factori genetici sau ecologici adiţionali. Tumorile pot fi heterotransplantate la animale deficiente imunologic sau virusul poate fi direct oncogen la animale sensibile.

Mononucleoza infecţioasă (MNI) (sinonime — febra ganglionară, boala Pfeiffer) este îmbolnăvirea care apare la aproximativ jumătate din cei care se infectează cu v.EB după vîrsta de 8 ani, mai ales, la adolescenţi şi adulţi tineri. Se manifestă ca febră, faringită, limfadenopatie, mai ales, cervicală, însă cu prinderea şi a altor regiuni, splenomegalie, frecvent leziuni hepatice, uneori icter, astenie ş.a. Hematologic se evidenţiază leucocitoză (10000—25000/mm^3), limfocitoză cu celule mononucleare atipice (mononucleoză), neutropenie, trombocitopenie. În faza acută a bolii virusul este prezent în faringe. În sîngele periferic se găsesc limfocite T (killer) citotoxice faţă de celulele infectate cu v. EB. Acest fapt sugerează interpretarea că, cel puţin parţial, sindromul de mononucleoză infecţioasă reflectă o reacţie acută de respingere (rejecţie) împotriva limfocitelor convertite viral.

Boli infecţioase însoţite de mononucleoză şi fenomene clinice asemănătoare îmbolnăvirii cu v. EB pot fi provocate de alţi agenţi etiologici — de exemplu, v. citomegalic (v. mononucleozei posttransfuzionale). Există însă modalităţi principale de identificare a îmbolnăvirilor produse de v. EB:

— demonstrarea prezenţei virusului în leucocite sau a creşterii titrului anticorpilor faţă de antigenele induse de v. EB;

— evidenţierea în serul bolnavilor a anticorpilor heterofili, aglutinanţi pentru hematiile de oaie (reacţia Paul-Bunnell) sau hematiile de cal, sau litici pentru hematiile de bovine. Aceşti anticorpi există într-un procentaj mare din cazuri, dar nu în toate.

Interesul pentru familia herpetovirusurilor a fost reînoit datorită membrilor oncogeni: v. Lucké (al adenocarcinomului renal la broasca

Scanned with OKEN Scanner

leopard), v. neurolimfomatozei Marek (la pui), v. Hinze (al limfomului iepurelui), alte virusuri ale reticulosarcoamelor și limfoamelor cîtorva specii animale, apoi v. EB izolat din limfomul uman Burkitt (1964). Datele pentru relația herpesvirusuri — tumori umane sînt din ce în ce mai convingătoare și prezintă o față nouă a biologiei acestor virusuri persistente în organism, nu numai a v. EB, dar și a v. HS mai ales, tip 2 și v. CM.

4.12. PICORNAVIRIDAE

Sînt virusuri de dimensiuni mici (pico = mic), cu diametrul de 27—30 nm, neînvelite, cu ARN monocatenar cuprins într-o capsidă icosaedrică ce conține 32 capsomere. Sînt răspîndite la mamifere, insecte, plante, bacterii.

În patologia umană sînt importante două genuri:

1. *Enterovirus*, cuprinzînd virusuri care se replică în tractul intestinal, de unde se răspîndesc spre diferite organe țintă;
2. *Rhinovirus*, incluzînd virusuri izolate din secreția nazală și din faringele celor cu guturai (tabel 4.23).

Tabel 4.23

Clasificarea Picornavirusurilor și principalele caractere

Grup	Tipuri antigenice	Stabilitate în pH 3—5	Stabilizare cu $MgCl_2$	Izolare în culturi de celule		Izolare pe șoarece sugar	Localizare principală la om
				Tip	Ecp		
1. *Gen Enterovirus*							
a. Poliovirus	3	stabil	+	RM,REU linii celulare	citocid în 2—3 zile	—	tract digestiv, SNC
b. Coxsackie A	23	stabil	+	—	—	miozită	tract digestiv, SNC, musculatură,
B	6	stabil	+	RM	citocid	encefalită, necroza grăsimii brune	tract digestiv, SNC, musculatură
c. Echovirus	31	stabil	+	RM,REU celule diploide umane	citocid (mai lent)	—	tract digestiv, SNC, piele
d. Enterovirus 68—71	4	stabil	+	RM,REU	citocid	—	tract digestiv, respirator, SNC,
2. *Gen Rhinovirus*	100	labil	+ —	* REU, celule diploide umane, organoculturi +	citocid	—	conjunctivă, tract respirator superior

RM = celule de rinichi de maimuțe
REU = culturi celulare de rinichi embrionar uman
* = dezvoltare optimă la 33°C.
+ = culturi de trahee embrionară umană; dezvoltarea virusului oprește mișcarea cililor epiteliali.

Scanned with OKEN Scanner

Separarea enterovirusurilor în subgrupele de mai sus s-a bazat, mai ales, pe istoria descoperirii lor și pe sistemul biologic pe care pot fi cultivate. S-a propus ca virusurile izolate după 1969 să fie notate simplu ca „enterovirusuri 69“... „enterovirusuri 71“, pentru cele izolate anterior păstrîndu-se în continuare nomenclatura originală.

Enterovirusurile manifestă tropism principal pentru tractul intestinal; la acest nivel, sau mai de grabă în sistemul limfatic atașat tubului digestiv (amigdale, ganglioni mezenterici, plăci Peyer), se petrece multiplicarea inițială, urmată de viremie, cu localizări secundare în diferite organe. Prezintă importanță tropismul pentru SNC manifestat de virusurile poliomielitice și, într-o măsură mai mică, de virusurile Coxsackie și Echo. Toate enterovirusurile pot afecta meningele, fiind cauză principală a meningitelor aseptice. De aceea, denumirea de enterovirus trebuie privită ca semnificînd o multiplicare primară la nivelul intestinului fără să fie urmată, de cele mai multe ori, de suferință intestinală. Tropismul lor este însă variat, de unde decurge și complexitatea manifestărilor clinice.

Stabilirea enterovirusurilor la poarta de intrare este controlată de IgA secretorii, iar localizarea consecutivă viremiei, de către anticorpii serici. Aceasta explică faptul că formele inaparente se întîlnesc în infecțiile cu enterovirusuri, cu o incidență ce depășește pe cea a îmbolnăvirilor clinice.

4.12.1. VIRUSURILE POLIOMIELITEI

Au un spectru restrîns de gazde (numai primatele) și manifestă tropism pentru SNC. Există trei tipuri antigenice: *tipul 1* (Brunhilde); *tipul 2* (Lansing); *tipul 3* (Leon). Cele trei tipuri au antigen fixator de complement comun, dar diferă prin seroneutralizare și nu determină protecție încrucișată.

Mutante avirulente de poliovirus se pot izola de la sănătoși sau din ape reziduale, ca urmare a vaccinării cu virusuri atenuate (se pot diferenția de tulpinile sălbatice prin testarea unor markeri de virulență).

Infecția la om. Majoritatea celor infectați fac forme clinice *nemanifeste*. Alteori, după o incubație de 7—14 zile apare *boala minoră* (abortivă) cu febră, cefalee, dureri musculare generalizate, angină, tulburări gastro-intestinale, simptome care cedează în cîteva zile. Forma *paralitică* apare numai la 1% din cei infectați, paralizia flască ce se instalează putînd interesa oricare grup muscular. Pot fi afectați centrii respiratori și vasomotori (paralizie bulbară), boala fiind letală. Uneori infecția se manifestă ca *meningită aseptică*.

Poliovirusul pătrunde în organism pe cale digestivă. Se multiplică în faringe și/sau intestin subțire, în țesutul limfoid anexat. Virusul se poate izola din faringe la începutul bolii și din fecale, în oricare perioadă a bolii. Din țesutul limfoid, prin viremie, se răspîndește putînd afecta neuronii motori din coarnele anterioare ale măduvei și din cortexul motor cerebral, cu apariția consecutivă a paraliziilor. Poliovirusul nu se multiplică în țesutul muscular *in vivo*, fenomenele paralitice fiind totdeauna secundare lezării neuronilor. Trecerea prin boală conferă imunitate specifică, de tip. Elaborarea IgA secretorii locale și a anticorpilor serici neutralizanți conferă protecție față de reîmbolnăvirea cu același tip.

Scanned with OKEN Scanner

Profilaxia specifică se realizează prin vaccinare cu vaccin viu atenuat, tip Sabin, obligatorie la noi în țară. În unele țări se mai folosește vaccinul Salk, inactivat cu formol. Virusul atenuat de tip 3, cuprins în vaccinul Sabin, este mai puțin stabil genetic, semnalîndu-se mutații înapoi, cu revenire la neurovirulență. Pot apare astfel paralizii la o proporție de 1 la 1 milion vaccinați cu tipul 3.

4.12.2. VIRUSURILE COXSACKIE ȘI ECHO

Virusurile Coxsackie au fost împărțite în două grupe: *A* cu 23 tipuri antigenice și *B* cu 6 tipuri antigenice (v. tabel 4.23). Separarea în cele două grupe s-a bazat pe natura leziunilor induse la șoricelul nou-născut, utilizat ca sistem biologic preferențial în izolare. Virusurile Coxsackie A produc paralizii flașce, cu moartea șoricelului în 3—7 zile. Histologic se evidențiază miozită generalizată cu degenerescență hialină a fibrelor striate și infiltrații de celule inflamatorii. Grupul B produce moartea animalului în 4—7 zile cu paralizie spastică. Histologic se remarcă miozită focală, miocardită, leziuni degenerative în SNC, pancreas, ficat și în grăsimea brună interscapulară.

Virusurile Coxsackie B și unele tipuri A pot fi cultivate și în culturi de celule.

Virusurile Echo, inițial izolate din fecale aparent fără legătură cu vreo îmbolnăvire, au fost denumite enteric — cytopathogenic — human — orphan. Ulterior au fost izolate din diverse îmbolnăviri. Se cunosc 31 tipuri antigenice separate prin seroneutralizare sau rfc, dar nu toate par implicate în îmbolnăviri umane.

Îmbolnăvirile cauzate la om de aceste enterovirusuri sînt mai frecvente la copii și se pot manifesta diferit (tabel 4.24). Pentru virusurile

Tabel 4.24

Îmbolnăviri cauzate de enterovirusuri

Virus	Îmbolnăvire	Tipuri antigenice frecvent incriminate
V. poliomielitei	— poliomielita paralitică — meningita aseptică — poliomielita abortivă	1, 2, 3
V. Coxsackie A	• herpangina	2, 4, 5, 6, 8, 10
	• boala „mînă, picior, gură", meningite aseptice și pareze guturai	*16*, *4*, 5, 7, 9, 10
V. Coxsackie B	• pleurodinia (boala Bornholm)	10, 21, 24
	• encefalomiocardita noului-născut	1—6
	miocardopatii la copii și adulți	1—6
	meningite aseptice și pareze guturai	1—5 1—6
V. Echo	meningite aseptice	3
	pareze și paralizii	4, 6, 9, 11, 14, 16, 30
	meningite cu erupție cutanată	6
Enterovirus 68	pneumonii, bronșiolite	9, 4, 16
Enterovirus 70	conjunctivită hemoragică	
Enterovirus 71	encefalite, meningite	

• = infecții caracteristice pentru grupul respectiv.

Scanned with OKEN Scanner

Coxsackie A se consideră ca infecție caracteristică *herpangina*, manifestată ca faringită severă, cu hiperemie, mici vezicule cenușii, situate pe peretele posterior al faringelui, pe stîlpii amigdalieni și pe bolta palatină. Boala „*mînă, picior, gură*", cauzată tot de grupul A, evoluează cu leziuni ulcerative faringiene însoțite de erupție veziculară pe palme și plante, care pot progresa spre brațe și picioare.

Pentru virusurile Coxsackie B este caracteristică *pleurodinia* manifestată prin febră, cefalee, dureri musculare generalizate, mai intense la nivelul toracelui, care persistă 2 zile—2 săptămîni. *Encefalomiocardita noului-născut* este o infecție severă cu Coxsackie B, deseori cu evoluție epidemică. Tipurile B_1—B_5 pot cauza pînă la 15% din carditele copiilor. Virusurile Echo reprezintă o cauză majoră a meningitelor aseptice.

4.12.3. RHINOVIRUSURILE

Sînt agenți etiologici majori ai *guturaiului*. Alături de rhinovirusuri mai cauzează guturai: coronavirusurile, unele enterovirusuri, VRS, virusurile paragripale, reovirusurile. Există peste 100 tipuri antigenice umane. Rhinovirusurile diferă de enterovirusuri prin labilitatea la *pH* acid.

Guturaiul apare după o incubație de 2—4 zile, cu secreție nazală abundentă, cefalee, tuse ușoară. Mucoasa nazală este edematiată, apar descuamare epitelială accentuată, infiltrații celulare. Infecțiile bacteriene secundare pot agrava evoluția, îndeosebi, la copii mici, la care pot apare traheobronșite, otite, sinuzite. Imunitatea este specifică de tip, rolul major revenind IgA secretorii locale.

4.13. REOVIRIDAE

Sînt virusuri răspîndite la mamifere (om, șoareci, bovine, maimuțe), clasificate în trei genuri: *Reovirus, Orbivirus, Rotavirus* și trei grupe de virusuri ale plantelor. Proprietățile generale ale familiei sînt redate în tabelul 4.25.

Genul Reovirus cuprinde virusuri izolate din tractul respirator și intestinal al omului, considerate „orfane" respirator — enteric — orfane), rolul lor în patologie nefiind precizat. Se apreciază că pot cauza infecții respiratorii minore. Există trei serotipuri, care au un antigen fixator de complement comun, diferențiindu-se prin seroneutralizare și hemaglutinare (reovirusurile aglutinează hematii de om). Testarea anticorpilor denotă o largă circulație a acestor virusuri, majoritatea populației dobîndind anticorpi față de cele trei tipuri pînă la 25—30 ani.

Genul Orbivirus include aproximativ 40 reprezentanți, ce se transmit prin insecte, încadrîndu-se între arbovirusuri. Pentru om prezintă importanță virusul febrei de Colorado.

Genul Rotavirus este implicat în gastroenterite ale copilului mic și ale animalelor nou-născute (viței, șoareci, purcei, maimuțe). Rotavirusurile umane au fost evidențiate prin microscopie electronică în ultrasecțiuni ale epiteliului duodenal prelevat biopsic și în filtratul de fecale

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.25

Caractere generale ale Reoviridaelor

	Reovirus	Rotavirus	Orbivirus
Diametru	60—80 nm	60—70 nm	60—70 nm
Acid nucleic	ARN dublu catenar 10 segmente	ARN dublu catenar 11 segmente	ARN dublu catenar 10 segmente
Simetrie	cubică, două capside Capsida externă cu 92 capsomere. 12 spini scurți la vîrfuri	cubică, două capside Stratul intern de capsomere iradiază spre capsida externă ca spițele unei roți (aspect de roată).	cubică, două capside Capsida externă difuză, acoperă capsida internă ce are 32 capsomere inelare.
Peplos	absent	absent	absent
Serotipuri	3	4 (antigen comun în capsida internă, antigene specifice de tip în capsida externă)	numeroase
Cultivare	Rinichi maimuță, linii celulare. Ecp lent, celule granulare, desprindere de pe sticlă. Incluzii perinucleare (aspect de bonetă).	Rotavirusurile animale se cultivă în culturi de celule. Tipurile umane nu se pot cultiva în serie pe celule; pot determina diaree la animale nounăscute, gnotobiotice.	

de la copii cu gastroenterite. Constituie o cauză majoră a enteritelor infantile, fiind responsabile în unele țări de 50—60% din diareile copilului mic, mai ales în sezonul rece. Boala apare după o incubație de 2—4 zile, manifestîndu-se cu diaree, vărsături, febră, dureri abdominale și deshidratare. Virusul pătrunde în enterocite, se multiplică în citoplasmă, modificînd funcțiile digestive și de absorbție, cu apariția diareei. Liza celulelor infectate eliberează virus în intestin, rezultînd cantități foarte mari de virus în fecale (10^{10} virioni/g fecale). Aceasta permite evidențierea lor în filtratul de fecale prin microscopie electronică sau imunelectronomicroscopie. Trecerea prin boală induce anticorpi serici și IgA locale; ultimelor li se atribuie rol în protecția față de reinfecție. În jurul vîrstei de 6 ani, 60—90% copii au anticorpi serici, denotînd circulația largă a rotavirusurilor la copiii mici. În enterite, la copii mai mari și la adulți rolul acestor virusuri este fără importanță.

4.14. ORTHOMYXOVIRIDAE ȘI INFECȚIA GRIPALĂ

În familia *Orthomyxoviridae* sînt incluse virusurile gripale de tip A, B și C, care au mare afinitate pentru receptori de natură mucoproteică (*myxa*=mucus), ceea ce le conferă proprietatea de mixofilie. Infecția gripală, prin marea morbiditate și mortalitate, continuă să rămînă o problemă medicală de mare importanță. Tipul A cauzează epidemii care cuprind largi colectivități, La intervale de 10—30 ani determină pandemii, cele mai cunoscute din istoria gripei fiind cele din 1890, 1918, 1957, 1968. Virusuri de tip A au fost izolate și de la alte gazde: cal, porc, păsări. Tipul B cauzează epidemii restrînse, iar tipul C deter-

Scanned with OKEN Scanner

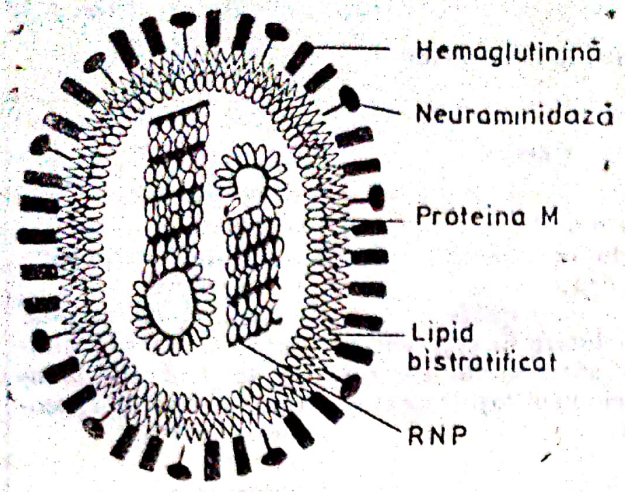


Fig. 4.21. Structura virusului gripal.

Componenta centrală este RNP (ribonucleoproteină) elicoidală cu diametrul de 9 nm. Proteina acestei structuri corespunde antigenului de tip, fixator de complement. Proteina M înconjoară RNP şi formează porţiunea internă a învelişului viral. Lipidele de înveliş sînt dispuse în dublu strat. Hemaglutinina are formă de bastonaş, iar neuraminidaza are aspect de ciuperci.

mină, de obicei, îmbolnăviri sporadice. Virusurile de tip C diferă de tipurile A şi B prin unele proprietăţi biologice şi de structură.

Proprietăţi generale. Sînt vivusuri cu ARN monocatenar, simetrie elicoidală (diametrul helixului este 6—9 nm), învelite. Virionii au forma sferică, cu diametrul de 80—120 nm, uneori apar forme filamentoase. Modelul structural al virusurilor gripale este redat în figura 4.21.

Reiese că virionul este alcătuit din două porţiuni:

a. *componenţa centrală,* ribonucleoproteina (RNP) sau nucleocapsida, formată din 8 segmente de ARN, fiecare reprezentînd o genă, cuplate cu subunităţi proteice. Alcătuirea din segmente a ARN explică frecvenţa mare a recombinărilor genetice. Asociată RNP se află transcriptaza virală;

b. *învelişul viral,* format dintr-un strat intern proteic (proteina matrix, de membrană sau M), care reprezintă aproximativ 40% din proteinele virale şi un strat extern, glicolipidic, preluat în cursul „înmuguririi" din membrana citoplasmatică a celulei gazdă. Lipidele sînt dispuse bistratificat şi reprezintă aproximativ 20% din componentele virale. Tratarea cu eter, solvenţi organici, detergenţi, solubilizează lipidele ducînd la pierderea puterii infective a virusului. Pe suprafaţa învelişului proemină ca nişte spini două tipuri de peplomere glicoproteice, codificate de virus: 1. hemaglutinina (H) răspunzătoare de capacitatea hemaglutinantă şi de ataşarea virusului pe receptorii celulei gazdă; 2. neuraminidaza (N) cu acţiune enzimatică, scindînd acidul neuraminic din receptorii mucoproteici, ducînd astfel la eluarea virusului de pe celula gazdă sau de pe hematii. Neuraminidazei i se atribuie rol în eliberarea virionului din celula gazdă.

Alte proprietăţi ale orthomyxovirusurilor sînt cuprinse în tabelul 4. 26. Spre deosebire de alte virusuri cu ARN, replicarea acidului nucleic viral şi asamblarea nucleocapsidei au loc în nucleul celulei gazdă; H şi N sînt sintetizate în citoplasmă, apoi încorporate în membrana citoplasmatică, modificînd antigenicitatea celulei şi conferindu-i noi proprietăţi (hemadsorbţie). Eliberarea virionilor progeni se face prin înmugurire, cu ajutorul neuraminidazei.

Structura antigenică. Se descriu două categorii de antigene:

1. *antigene interne,* reprezentate de RNP virală (antigene „solubile"), evidenţiate prin rfc, caracteristice de tip, ducînd la separarea în cele trei tipuri antigenice: A, B, C. Nu există reacţii încrucişate între tipuri. In cadrul tipului A toate tulpinile, inclusiv cele animale şi aviare, conţin acelaşi antigen RNP, deosebit de al tipului B şi C. Alte proteine interne (proteina M, ARN-polimeraza) sînt de asemenea antigenice;

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.26

Principalele proprietăţi ale virusurilor gripale

Formă	sferică, uneori filamentoasă
Diametrul virionului	80—120 nm
Diametrul helixului	6—9 nm
Înveliş	prezintă înveliş lipidic
Simetrie	elicoidală
Acid nucleic	ARN monocatenar, 8 segmente Recombinări genetrice frecvente
Mixofilie	prezentă
Hemaglutinină	prezentă. Hemaglutinează hematii de pasăre, om, cobai etc.
Replicare	replicarea ARN şi asamblarea nucleocapsidei se petrec în nucleul celulei gazdă. H şi N se sintetizează în citoplasmă
Cultivare	— oul de găină embrionat este procedeul de elecţie — culturi de celule (RM*, REU* ,linii celulare) cu efect minim la izolare, accentuat prin pasaj, celulele infectate dobîndesc proprietatea de hemadsorbţie.
Infecţie experimentală	— dihorul (foarte sensibil) a permis izolarea primului virus gripal A (1933) — şoarecele alb : tulpinile adaptate induc consolidări pulmonare masive şi moartea.

* RM = rinichi de maimuţă; REU = rinichi embrionar uman.

2. *antigene de înveliş,* reprezentate de H şi N, fiecare cu calităţi antigenice proprii şi care permit separarea virusurilor gripale (îndeosebi a tipului A) în numeroase variante. Antigenul H este puternic imunogen, inducînd elaborarea de anticorpi inhibanţi ai hemaglutinării şi neutralizanţi ai puterii infective. Neuraminidaza induce anticorpi inhibitori ai neuraminidazei. Există înrudiri între antigenele H şi N ale virusurilor A umane, animale şi aviare.

Antigenele de înveliş sînt supuse fenomenului de *variaţie antigenică,* exprimat îndeosebi la tipul A şi care prezintă o mare importanţă pentru epidemiologia gripei. O modificare în structura H şi/sau N determină schimbarea antigenicităţii, cu apariţia de noi variante, care diferă de cele ce au circulat anterior. Pentru tipul B variaţia antigenică este mai puţin exprimată, iar la tipul C nu a fost constatată.

Se descriu două tipuri de variaţii antigenice:

a. *minore,* progresive, cu modificări mici în structura şi antigenicitatea proteinelor de înveliş, contribuind la apariţia unor variante ce se deosebesc doar în mică măsură de cele ce au circulat în anii precedenţi. Astfel de modificări se observă la virusurile de tip A (umane şi animale) şi de tip B, care determină epidemii sau cazuri sporadice în perioadele interepidemice. Se acceptă că variaţiile minore apar prin mutaţie; selecţia mutantelor este asigurată prin imunitatea populaţiei;

b. *majore,* discontinui, descrise la tipul A. Constau în modificări bruşte şi extinse în structura H sau/şi N, determinînd apariţia tulpinilor pandemice, cu mari diferenţe antigenice faţă de variantele care au circulat anterior. Mecanismul prin care apar variaţiile majore este recombinarea genetică între virusuri care se replică concomitent în aceiaşi celulă gazdă; alcătuirea segmentată a genomului viral favorizează recombinarea. Pe baza acestor variaţii la virusurile A umane au fost separate patru subtipuri de hemaglutinină (H_0, H_1, H_2, H_3) şi două subti-

Scanned with OKEN Scanner

puri de neuraminidază (N_1, N_2). În mod similar au fost identificate subtipuri de H și N la virusurile aviare, ecvine și porcine.

Din anul 1971 s-a adoptat un sistem de nomenclatură a virusurilor gripale, care să cuprindă descrierea tulpinilor și caracterizarea H și N, permițînd astfel compararea antigenică a noilor tulpini izolate (tabel 4.27).

Tabel 4.27

Sistemul de nomenclatură a virusurilor gripale (1971)

Sistemul cuprinde: 1. Descrierea tulpinii: — precizarea tipului de antigen RNP: A, B, C — gazda naturală: pentru virusurile animale și aviare — originea geografică — numărul tulpinii — anul izolării
2. Caracterizarea antigenelor de înveliș: precizarea subtipului de H și N. * Exemple: A/ Hong Kong/1/68 (H_3N_2) A/Victoria/3/75 (H_3N_2) A/New Jersey/8/76 (Hsw_8N_1) A/turkey/Wisconsin/1/66 (Hav N_2) A/swine/Taiwan/1/70 (H_3N_2)

* Această descriere a tulpinilor arată că virusul uman A/Victoria/75 este similar antigenic cu un virus porcin izolat în Taiwan în 1970 și că virusul A/New Jersey, care a cauzat în 1976 o epidemie severă la recruții din Fort Dix, are antigene H și N comune cu ale virusurilor porcine.

Cercetările din ultimii ani au relevat similarități între unele antigene H și N umane și animale, motiv pentru care în 1980 s-a propus o reclasificare în 11 subtipuri de H și 8 subtipuri de N, indiferent de specia animală la care s-au detectat aceste antigene.

Este de menționat faptul că pe măsură ce au apărut noi variante antigenice de virus gripal, acestea au înlocuit vechile variante, care au dispărut din circulație. O situație mai puțin obișnuită se constată în prezent, cînd circulă concomitent variante cu caractere antigenice diferite: H_3 N_2, H_1 N_1 și H_2 N_2.

Fenomenul de variație antigenică prezintă importanță întrucît apariția de noi variante a coincis totdeauna cu apariția de epidemii și pandemii.

Infecția la om. Gripa se manifestă cu febră, catar oculo-nazal, tuse, cefalee, dureri musculare și oculare. La copii, tipul A cauzează uneori laringite sufocante. Mai rar, gripa evoluează ca o pneumonie interstițială severă. Suprapunerea bacteriilor (hemofili, pneumococi, stafilococi, streptococi, bacili gramnegativi) duce la bronhopneumonii grave, cu letalitate crescută, mai ales la vîrstnici și copii mici. Au fost descrise complicații de tipul encefalitei și miocarditei. După gripa B se poate instala sindromul Reye, manifestat prin encefalopatie și degenerescență grasă a ficatului, cu mortalitate crescută. Mai rar s-a descris după gripa A sau după varicelă sindromul Reye.

Virusul gripal pătrunde în organism pe cale respiratorie. Neuraminidaza scade viscozitatea mucusului respirator, favorizînd atașarea virionilor pe receptorii celulelor epiteliale. Apar fenomene inflamatorii

Scanned with OKEN Scanner

și necroze ale epiteliului ciliat, localizate îndeosebi în tractul respirator superior. Căile inferioare sînt mai rar interesate. Necrozele și descuamarea celulelor epiteliale favorizează suprainfecțiile bacteriene.

Prezența în mucusul respirator a inhibitorilor nespecifici și mai ales a Ig A secretorii poate preveni atașarea virionilor și penetrarea în celule.

După infecția gripală se instalează o imunitate specifică de tip și de variantă. La copiii mici spectrul de anticorpi antigripali este îngust, dar devine progresiv mai larg cu vîrsta. Expunerea la tulpini înrudite antigenic va accentua anticorpii primari, astfel încît cel mai mare titru de anticorpi la o anumită grupă de vîrstă reflectă antigenele dominante ale virusului responsabil de infecțiile din copilărie ale grupului.

Profilaxia gripei se realizează cu vaccinuri preparate din tulpini circulante. Există vaccinuri preparate din virusuri inactivate cu formol și vaccinuri cu virusuri vii, cu virulența atenuată. Se încearcă în ultimul timp prepararea vaccinurilor din mutante ts și din tulpini recombinante. La noi în țară se utilizează în prezent un vaccin preparat din hemaglutinine purificate.

S-a preconizat aplicarea chimioprofilaxiei cu amantadină, care împiedică adsorbția virusului de tip A pe receptorii celulelor epiteliului respirator. La contacți, preparatul trebuie administrat precoce pentru prevenirea infecției.

4.15. PARAMYXOVIRIDAE

Sînt asemănătoare prin morfologie și structură cu orthomyxovirusurile, cu care au fost inițial clasificate. În această familie sînt incluse trei genuri: a. *Paramyxovirus*, cu virusurile paragripale și virusul urlian; b. *Morbillivirus*, cu virusul rujeolei; c. *Pneumovirus*, cu virusul respirator sincițial (VRS).

Paramyxovirusurile au morfologie asemănătoare cu orthomixovirusurile (formă sferică, nucleocapsidă cu simetrie helicoidală, înveliș lipidic bistratificat cu peplomere care proemină ca niște spini la suprafața virionului), dar diametrul particulei virale și diametrul helixului sînt mult mai mari. Proprietatea de mixofilie și capacitatea hemaglutinantă sînt prezente și la paramyxovirusuri, care, spre deosebire de orthomyxovirusuri pot avea și proprietăți hemolitice. ARN nu este segmentat la grupul paramyxo și replicarea se petrece în întregime în citoplasma celulei gazdă. Toate paramyxovirusurile se pot cultiva în culturi de celule, în care induc un ecp de tip sincițial, discret la început și accentuat prin pasaje. Detectarea dezvoltării virale în culturi celulare se poate face timpuriu prin hemadsorbție (cu excepția VRS). Infecțiile produse pot fi localizate la nivelul tractului respirator (paragripale, VRS) sau sînt infecții generalizate (rujeolă, oreion). Virusul rujeolos, unele virusuri paragripale au fost incriminate în producerea infecțiilor persistente (PESS, scleroză în plăci).

Aceste caractere generale ale paramyxovirusurilor sînt cuprinse în tabelul 4.28.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.23

Proprietăţi generale ale paramyxovirusurilor

— Virioni pleomorfi, diametrul 150—300 nm
— Nucleocapsida cu simetrie elicoidală
— Înveliş lipidic cu hemaglutinină, uneori şi neuraminidază, ARN monocatenar, nesegmentat
— Transcriptază proprie în virion

	V. urlian	V. paragripale	V. rujeolei	VRS
Diametrul helixului	18 nm	18 nm	18 nm	13,5 nm
Mixofilie	+	+	+	+
*Hemaglutinină	+	+	+	—
Neuraminidază	+	+	—	—
**Hemolizină	+	+	+	—
Fuziune celulară	+	+	+	+
Hemadsorbţie	+	+	+	—
Cultivare în ou embrionat	+	—	adaptare	—
Cultivare în culturi de celule	+	+	+	+
Incluzii	Citoplasmatice	Citoplasmatice	Nucleare şi citoplasmatice	Citoplasmatice
Tipuri antigenice	1	4	1	2
Infecţii	oreion	infecţii respiratorii	rujeola PESS	infecţii respiratorii

* V. urlian aglutinează hematii de pasăre, paragripalele hematii de cobai, v. rujeolos hematii de maimuţă.
** Este distinctă de hemaglutinină.
Culturi primare (de rinichi de maimuţă, de rinichi embrionar uman) sau linii celulare.

4.15.1. VIRUSURILE PARAGRIPALE

(Paramyxovirus parainfluenzae)

Au fost izolate după 1950 în culturi de celule, datorită proprietăţii de hemadsorbţie, ecp fiind discret la izolare. Se cunosc patru tipuri antigenice, notate cu 1, 2, 3, 4, tipul 4 avînd subtipurile A şi B. În primele trei tipuri au fost încadrate şi tulpini izolate de la animale; virusuri de tip 1 (Sendai) s-au izolat de la şoareci şi porci; virusuri simiene de tip 2 (SV_5, SV_{41}) sînt contaminaţi frecvenţi ai culturilor de rinichi de maimuţă, creînd confuzii de diagnostic; un virus de tip 3 a fost izolat de la bovine cu boli acute respiratorii. Virusurile izolate de la animale nu cauzează îmbolnăviri la om. Tulpinile umane nu sînt patogene pentru animalele de laborator.

Infecţii la om: 18—20% din îmbolnăvirile respiratorii acute virale sînt cauzate de virusurile paragripale. La copii apar infecţii severe de tipul bronşitei, bronşiolitei şi pneumoniei, îndeosebi cu tipul 3. În etiologia laringotraheitelor sufocante (crup), paragripalele intervin în cel puţin 50% din cazuri (mai ales tipul 2). La copii mai mari şi la adulţi, infecţiile evoluează mai ales ca rinofaringite sau guturai. Infecţiile para-

Scanned with OKEN Scanner

gripale, au, în general, o evoluţie endemo-epidemică; tipul 3 poate cauza uneori în colectivităţi de copii explozii epidemice asemănătoare gripei.

Infecţiile paragripale apar timpuriu în cursul vieţii. Pînă la 4 ani majoritatea copiilor trec printr-o infecţie, îndeosebi cu tipul 3, iar la 6—10 ani aproape toţi copiii au anticorpi faţă de toate tipurile. Sînt posibile reinfecţii la persoane care au anticorpi serici, dar au nivel scăzut de IgA secretorii, rolul principal în imunitate fiind atribuit IgA prezente în tractul respirator. Sînt posibile infecţii repetate cu virusuri paragripale în decursul vieţii.

4.15.2. VIRUSUL URLIAN

(Paramyxovirus parotitidis)

Este agentul etiologic al **parotiditei epidemice** (oreion), care se manifestă prin tumefierea uni sau bilaterală a glandelor parotide. Boala evoluează endemic sau epidemic în colectivităţile de copii şi tineret, afectînd îndeosebi vîrsta de 5—15 ani.

Se remarcă tropismul deosebit al virusului urlian pentru ţesuturile glandulare (glande salivare, gonade, pancreas) şi pentru SNC.

Virusul urlian se multiplică iniţial la nivelul glandelor salivare (sau în mucoasa tractului respirator superior), după care se răspîndeşte prin sînge (viremie) spre ţesuturile glandulare şi spre SNC.

Boala la om apare după o incubaţie de 18—21 zile, cu tumefierea glandelor parotide, eventual şi a altor glande salivare, însoţită de durere. Dacă infecţia survine în perioada pubertăţii sau după pubertate, pot apare complicaţii de tipul orhiepididimitei (care poate duce la sterilitate) sau a ovaritei.

Localizarea virusului în pancreas duce la apariţia pancreatitei, însoţită de hiperglicemie şi glicozurie. Importanţă deosebită prezintă afectarea SNC, cu apariţia meningitei sau meningoencefalitei. Uneori meningita este singura manifestare a infecţiei urliene. Se apreciază că 10—15% din meningitele cu lichid clar sînt cauzate de virusul urlian. Mai rar, în cursul parotiditei apar complicaţii de tipul tiroiditei, nefritei, poliartritei. Uneori infecţiile urliene sînt inaparente clinic, dar conduc la instalarea imunităţii.

După infecţia urliană rămîne o imunitate solidă, pentru toată viaţa. Starea de hipersensibilitate, de tip tardiv, care se instalează în cursul infecţiei, poate fi evidenţiată prin intradermoreacţia cu antigen viral.

Pentru profilaxia specifică a bolii au fost preparate vaccinuri inactivate cu formol, înlocuite astăzi cu vaccinuri virale vii, cu virulenţa atenuată. În unele ţări vaccinul urlian viu a fost asociat cu vaccinurile vii atenuate antirujeolos şi antirubeolos (trivaccin), ducînd la scăderea morbidităţii şi protejînd colectivităţile de copii şi tineret.

4.15.3. VIRUSUL RUJEOLEI

Cauzează **rujeola,** boală eruptivă a copilăriei, cu mare contagiozitate, caracterizată prin erupţie cutanată, simptome respiratorii. Virusul rujeolei pătrunde în organism pe cale respiratorie şi conjunctivală, re-

Scanned with OKEN Scanner

plicîndu-se masiv la nivelul porţii de intrare. Prin sistemul limfatic pătrunde în circulaţia generală inducînd viremia iniţială. Virusul pătrunde apoi în celulele SRE unde se multiplică, trece din nou în circulaţie, cu apariţia viremiei secundare. Virusul este prezent în leucocite, în care se replică, determinînd alterări cromozomiale şi favorizînd larga diseminare a virusului. Ca urmare, virusul rujeolei ajunge la mucoasa respiratorie (de unde se elimină masiv) şi la nivelul tegumentelor, unde va apare erupţia, datorită reacţiilor antigen-anticorp ce se petrec în endoteliul vascular.

Boala la om apare după o incubaţie de 10 zile, debutînd cu catar oculo-nazal, febră, semnul lui Köplick (macule mici, roşii, cu centrul albicios pe mucoasa gingivală), urmat de erupţia maculo-papuloasă. Uneori boala evoluează atipic, ca o pneumopatie cu celule gigante, multinucleate, totdeauna mortală. În cursul rujeolei pot apare (în pînă la 15% cazuri) complicaţii bacteriene (pneumonii, otite, meningite). Au fost descrise encefalite posteruptive, cauzînd o mare mortalitate la copiii mici, produsă prin mecanisme imunopatologice. În ultimul timp s-a făcut legătura între virusul rujeolos (sau o variantă a acestuia) şi panencefalita sclerozantă subacută (PESS), o boală degenerativă a sistemului nervos, totdeauna letală; PESS este încadrată între infecţiile persistente lente.

Profilaxia rujeolei se face cu vaccinuri preparate din virusuri vii cu virulenţa atenuată. Astfel de vaccinuri s-au obţinut din tulpina Edmonston sau din varianta supraatenuată Schwartz, conferind o bună protecţie. Vaccinarea antirujeoloasă face parte dintre vaccinările obligatorii aplicate în ţara noastră.

4.15.4. VIRUSUL RESPIRATOR SINCIŢIAL (VRS)

Caracterele VRS sînt întrucîtva deosebite faţă de a celorlalte paramyxovirusuri, ceea ce reiese şi din tabelul 4.28. VRS prezintă importanţă deosebită în patologia infecţioasă a copilului mic, fiind agentul etiologic major al unor infecţii severe de tipul bronşiolitei şi bronhopneumoniei. Se apreciază că peste 50% din bronşiolite şi 25% din bronhopneumoniile copilului mic sînt cauzate de VRS. O gravitate deosebită se remarcă în infecţiile ce survin la copii în primele 6 luni de viaţă, procentul de mortalitate fiind ridicat. La copii mai mari şi la adulţi VRS determină infecţii uşoare de tipul rinofaringitelor, avînd rol uneori şi în exacerbarea bronşitelor cronice.

Suprainfecţiile bacteriene sînt rare în infecţiile cu VRS. În apărarea faţă de infecţiile cu VRS un rol important se atribuie Ig A secretorii, prezente în tractul respirator. Copilul mic, în primele luni de viaţă, nu are astfel de anticorpi, ceea ce explică infecţiile frecvente şi grave ce pot avea loc chiar în prezenţa unor titruri crescute de anticorpi serici materni. S-a emis chiar ipoteza că reacţiile antigen VRS — anticorpi materni, ce se petrec la nivelul tractului respirator, ar fi răspunzătoare de fenomenele bronşiolare grave ce apar la sugari.

Scanned with OKEN Scanner

Coronaviridae

Cuprind virusuri umane, izolate din îmbolnăviri ale tractului respirator superior, virusuri ale altor mamifere (virusul hepatitei șoarecelui, al gastroenteritei porcine) și virusuri care cauzează bronșita infecțioasă aviară.

Proprietățile sînt asemănătoare cu a orthomyxoviridelor: au formă sferică, cu diametrul de 80—160 nm. Nucleocapsida, cu simetrie elicoidală are diametrul de 7—9 nm și conține o singură moleculă de ARN monocatenar. Sînt virusuri învelite, la suprafața învelișului lipidic fiind prezente proeminențe asemănătoare cu petalele de flori sau cu coroana solară. Unele coronavirusuri aglutinează hematii de pasăre. Se cunosc cîteva serotipuri umane, la care se descriu antigene fixatoare de complement și hemaglutinante.

Cultivarea este dificilă. Unele tipuri se dezvoltă în organo-culturi de trahee embrionară umană, în care replicarea virală determină încetarea mișcării cililor epiteliali. Alte tipuri se cultivă în culturi primare de rinichi embrionar uman sau sînt adaptate pe creier de șoarece nounăscut.

La om, coronavirusurile produc aproximativ 10% din guturaiuri, îndeosebi la adulți, în sezonul de iarnă. Pot participa în exacerbarea bronșitelor cronice și este probabilă intervenția lor în sindromul diareic.

4.16. VIRUSUL RUBEOLEI. RUBEOLA

Încadrarea virusului rubeolei într-una din familiile recunoscute a constituit obiectul a numeroase controverse. Posedă caracterele familiei *Togaviridae:* virus cu ARN monocatenar, nucleocapsidă icosaedrică, învelit, cu diametru de 60 nm. Se deosebește însă de ceilalți reprezentanți (arbovirusuri), prin modul de transmitere aerogen. Deocamdată este singurul reprezentant al genului *Rubivirus,* din familia *Togaviridae.*

Se cultivă pe culturi celulare cu producere de ecp, sau fiind evidențiat prin interferență virală (împiedecă dezvoltarea v. $ECHO_{11}$).

Este agentul etiologic al **rubeolei,** boală eruptivă a primei copilării. În urma infecției pe cale respiratorie și a viremiei, apar semnele clinice, caracterizate, mai ales, prin febră, adenopatie suboccipitală, cervicală și retroauriculară, erupție tegumentară, uneori artralgii, mialgii și parestezii. Boala evoluează favorabil, cu vindecare în scurtă vreme.

Infecția rubeolică are însă consecințe grave dacă se produce la gravide în primul trimestru al sarcinii (mai ales prima lună). Transmiterea transplacentară a virusului la făt induce o infecție necitocidală, datorită căreia celulele se divid mai încet, nu are loc diferențierea normală și se instalează numeroase și variate malformații congenitale. Acestea se evidențiază de multe ori la naștere (defecte cardiace, oculare, osoase, anemii hemolitice etc.), urmate uneori de moartea bolnavului în primul an de viață. Alteori, manifestările clinice se observă numai după cîteva luni (surditate, retardare mintală etc.). În rubeola

Scanned with OKEN Scanner

congenitală, virusul poate fi prezent în organism şi ca atare eliminat, pînă la doi ani.

Ţinînd cont de faptul că o parte dintre tinere nu au contractat boala în copilărie, fiind deci receptive, au fost introduse în practică vaccinuri cu virusuri vii atenuate. Cele mai utilizate sînt vaccinul Cendehill, cultivat pe celule de iepure şi RA 27/3 (pe celule diploide umane). Vaccinarea se aplică fetelor de 12—14 ani.

4.17. RHABDOVIRIDAE

Cuprinde reprezentanţi care infectează mamifere, vertebrate cu sînge rece, insecte şi plante. Studiile asupra virusului stomatitei veziculare a bovinelor (VSV) au furnizat o mare parte a cunoştinţelor asupra acestei familii. Unele *Rhabdoviridae* (de exemplu, VSV) pot fi încadrate ca arbovirusuri.

Pentru patologia umană cel mai important reprezentant este virusul rabic. Etiologia virală a **rabiei** (turbarea) a fost presupusă încă din secolul trecut, de către P a s t e u r, care a preparat primul vaccin antirabic cu mult timp înainte ca natura agentului infecţios să fie precizată. Proprietăţile virusului rabic sînt cuprinse în tabelul 4.29.

Tabel 4.29

Proprietăţile virusului rabic

Forma	de glonţ
Diametre	80/180 nm
Nucleocapsida	simetrie elicoidală
Acid nucleic	ARN monocatenar, nesegmentat
Înveliş	are înveliş lipidic
HA	prezintă hemaglutinine (aglutinează hematiile de gîscă)
Replicare	în citoplasma celulei gazdă, maturare în membrana citoplasmatică. Eliberare prin înmugurire. Are transcriptază proprie.
Cultivare	linii celulare (BHK) celule umane diploide adaptare pe embrion de pasăre
Infecţii experimentale	numeroase animale de laborator sînt sensibile (iepure, cobai, hamster, şoarece)

Virusul rabic izolat de la animalul bolnav este numit virus sălbatic sau „de stradă". Inoculat la animale susceptibile produce boala după incubaţii lungi şi variabile, determină incluzii citoplasmatice (corpii Babeş—Negri) în neuroni şi poate invada glandele salivare. Prin inocularea virusului „de stradă" la iepure, intracerebral, în pasaje succesive, P a s t e u r a obţinut virusul rabic „fix", care induce boala la iepure după o incubaţie fixă, de 6 zile. Acest virus nu se mai multiplică în ţesuturile extraneurale, iar incluziile citoplasmatice sînt absente. Vi-

Scanned with OKEN Scanner

rusul fix a servit ca punct de plecare pentru prepararea vaccinurilor antirabice.

Rabia este o zoonoză, infecţia la om apărînd accidental, în urma muşcăturii unui animal bolnav de rabie. Virusul rabic infectează un mare număr de animale sălbatice (vulpe, lup, jder, veverițe, şacal etc.) şi domestice (cîine, pisică, bovine etc.). Pentru om cele mai importante surse de infecţie sînt cîinele, pisica, vulpea, lupul. Un rol important în menţinerea infecţiei rabice în natură se atribuie liliecilor (mai ales, hematofagi), care transmit virusul altor vieţuitoare prin muşcătură; se admite că aerosolii creaţi de excreţiile liliecilor ce poartă virus rabic pot determina infecţii letale (la speologi).

Boala la om. Virusul rabic prezent în saliva animalului este inoculat la om prin muşcătură. Incubaţia este în medie de 30—40 zile. În perioada de debut se remarcă hiperestezie şi prurit la nivelul plăgii, modificări de caracter, anxietate. Encefalita rabică, prezentă în perioada de stare, se manifestă prin halucinaţii, agitaţie, spasme dureroase ale musculaturii deglutiţiei, care determină „hidrofobie". Moartea este precedată de paralizii şi comă.

Virusul rabic se transmite de la nivelul plăgii, pe calea tractului nervos, pînă la S.N.C., multiplicîndu-se abundent în cortexul cerebral şi cerebelar, în ganglionii bazali şi în coarnele posterioare ale măduvei spinării. Se produc necroze ale celulelor nervoase, fenomene de neuronofagie, infiltraţii cu celule mononucleare. Prezenţa în neuroni a incluziilor citoplasmatice acidofile (corpii Babeş—Negri) se consideră patognomonică pentru rabie. Din SNC virusul rabic se răspîndeşte pe calea nervilor periferici spre glandele salivare, în care se multiplică, eliminîndu-se prin salivă.

Profilaxia rabiei. O serie de măsuri se adresează supravegherii animalelor: vaccinare, carantinare riguroasă, măsuri ce au dus la eradicarea bolii în unele zone geografice (Anglia, Australia). La persoanele muşcate se practică vaccinarea antirabică. Pasteur a preparat primul vaccin antirabic din măduva de iepure inoculat cu virus „fix", uscată la 22—23°C, intervale variabile de timp. Vaccinurile de tip Semple sau de tip Fermi reprezintă suspensii de creier de iepure şi, respectiv de oaie, obţinute de la animale inoculate cu virus fix; suspensiile sînt inactivate cu fenol. Aceste vaccinuri pot cauza encefalite alergice ca rezultat al fenomenelor de hipersensibilizare. Vaccinul preparat pe creier de şoarece nou-născut reduce mult riscul encefalitei alergice. În SUA este larg aplicat vaccinul preparat în culturi de ţesut embrionar de raţă. În vaccinarea animalelor domestice se utilizează vaccinul viu atenuat, de tip Flury, cu virus adaptat la embrion de pasăre. S-a preparat un vaccin antirabic pe culturi de celule diploide umane, cu capacitate imunogenă bună şi fără riscul encefalitei (vaccin inactivat cu beta-propiolactonă).

Seroprofilaxia antirabică preconizată de Babeş este indicată în muşcături profunde; serul se administrează în doză unică asociată primei doze de vaccin. Astăzi, serul antirabic este înlocuit cu imunoglobuline antirabice umane.

Scanned with OKEN Scanner

4.18. ARBOVIRUSURI. ARENAVIRIDAE

4.18.1. ARBOVIRUSURI

Grupul *Arbovirus* (arthropod borne viruses), creat pe criterii ecologice și epidemiologice, cuprinde virusuri ce se multiplică în artropode hematofage (țînțari, căpușe, flebotomi) și sînt transmise vertebratelor prin înțepătură. Din cele peste 400 tipuri antigenice identificate (mai ales, prin reacții de neutralizare), aproximativ 40 sînt mai importante pentru patologia umană. Aceste virusuri aparțin unor grupe taxonomice diferite. Principalele familii ce cuprind arbovirusuri *(Togaviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae)* sînt redate în tabelul 4.30.

Cultivarea arbovirusurilor, cu unele deosebiri de la o familie la alta, se realizează pe șoarece, șobolan, ou embrionat sau culturi celulare.

Distribuția ecologică a vectorilor și gazdelor naturale (păsări, rozătoare, animale sălbatice etc.) determină aria de răspîndire a unui virus și desigur importanța sa în patologia umană. Virusurile se mențin în natură printr-un ciclu de infectare: artropod → animal gazdă → artropod. În urma transmisiei prin artropode, are loc multiplicarea în organismul vectorului și gazdelor, determinînd de multe ori infecții inaparente. Omul, ca și animalele domestice (cal, oaie, porc), nu au rol important în ciclul natural; se infectează accidental cînd ajunge într-un anumit ecosistem, dominat de virusul respectiv (lucrări hidrotehnice, mlaștini, jungle etc.). Nu poate fi neglijată migrația anuală a păsărilor.

Virusul pătruns în organismul uman difuzează pe cale sanguină, multiplicîndu-se în endoteliile vasculare, țesutul limfatic sau mieloid, ficat, rinichi, S.N.C. etc. În afara numărului mare de infecții nemanifeste clinic, s-au descris îmbolnăviri variate, tabloul clinic fiind determinat mai ales de localizarea în țesuturi și multiplicarea virală. În general se apreciază că principalele îmbolnăviri umane pot fi grupate în trei sindroame principale:

a. *febrele cu artralgii și uneori eritem* au ca prototip febra denga (familia *Togaviridae* — genul *Flavivirus).* Temperatura ridicată este însoțită de cefalee, mialgii, artralgii, uneori eritem maculo-papular. Evoluția bifazică (cîteva zile de sănătate aparentă între două etape de boală) caracterizează multe arboviroze. Vindecarea frecventă este urmată de o astenie ce poate dura cîteva săptămîni. Leucopenia cu limfocitoză relativă constituie cel mai important semn de laborator clinic. Infecțiile cu virusuri *Chicungunyia, Sindbis,* grupul *Bunyamwera, West-Nile, Tahyna, Papatassi,* al febrei de căpușă din Colorado și altele au, de obicei, o evoluție asemănătoare;

b. *febrele hemoragice* se manifestă prin peteșii, frecvent cu hemoragii masive ale mucoaselor (gastrointestinale, nazale etc.), datorate interesării endoteliilor vasculare. La acestea se adaugă leziuni viscerale (hepatice, renale, miocardice), care duc deseori la deces. Pe prim plan se află febra galbenă produsă de un flavivirus din familia *Togaviridae,* cu evoluție epidemică în unele teritorii. Din această grupă mai fac parte denga hemoragică, febra de Kyasanur (India), febra de Crimeea —Congo ș.a.

Scanned with OKEN Scanner

Principalele arbovirusuri care produc îmbolnăviri umane

Virusuri	Vector	Boala	Distribuţia geografică
1. *Togaviridae*			
a. Alphavirus (grup A)			
— virusurile encefalitelor ecvine de est (EEE), de vest (WEE), de Venezuela (VEE)	Ţînţar	Encefalită	America de Nord şi Sud
— V. Sindbis	Ţînţar	Febră cu artralgii	Africa, India, Australia
— V. Chikungunya	Ţînţar	Febră cu artralgii	Africa, Asia
b. Flavivirus (grup B)			
— V. encefalitei de Saint—Louis	Ţînţar	Encefalită	America de Nord şi Sud
— V. encefalitei japoneze B	Ţînţar	Encefalită	Asia
— V. West—Nile	Ţînţar	Febră cu artralgii	Africa, Orientul mijlociu
— V. bolii denga (4 tipuri serologice)	Ţînţar	Febră cu artralgii, febră hemoragică	Asia de Sud, Africa, zona Pacificului, America Centrală, zona mediteraneană
— V. febrei galbene	Ţînţar	Febră galbenă	Africa, America de Sud şi Centrală
— V. encefalitei ruse de primăvară-vară	Căpuşe	Encefalită	Europa, Asia
— V. febrei de Kyasanur	Căpuşe	Febră hemoragică	India
2. *Bunyaviridae*			
— Grupul California (11 reprezentanţi)	Ţînţar	Encefalită	America de Nord şi Sud
— Grupul Bunyamvera (18 reprezentanţi)	Ţînţar	Encefalită, febră cu artralgii	Asia, America, Africa
— V. febrei hemoragice de Crimeea—Congo	Căpuşă	Febră hemoragică	Europa, Asia, Africa
— V. febrei de flebotom (papatassi)	Flebotom	Febră cu artralgii	Africa de Nord, Bazinul mediteranian, Brazilia
— V. Tahyna	Ţînţar	Febră cu artralgii, encefalită	Europa
3. *Reoviridae* (gen Orbivirus)			
— V. febrei de căpuşă din Colorado	Căpuşă	Febră cu artralgii	America de Nord
4. *Rhabdoviridae*			
— V. stomatitei veziculare	Ţînţar, Felbotom	Febră cu artralgii	America de Nord, Africa, India
— V. Marburg, V. Ebola (probabil nou grup)	?	Febră hemoragică	Africa, Europa
5. *Arenaviridae*			
— V. Lassa, V. Junin, V. Machupo	?	Febră hemoragică	Africa, America de Sud

Scanned with OKEN Scanner

În ultimii ani s-au descris asemenea îmbolnăviri grave, uneori epidemice ocazionate de virusuri din familia *Arenaviridae*, precum și de virusurile Marburg și Ebola, apreciate de unii autori ca *Rhabdovirusuri*, iar de alții ca și neclasificate (febra de Sudan—Zair). La aceste virusuri nu s-a putut dovedi transmiterea prin vectori, ci numai datorită rozătoarelor și prin contact interuman. Periculozitatea deosebită a acestor infecții constă în ușurința cu care apar cazurile secundare după contactul cu bolnavul și gravitatea lor;

c. *encefalitele* cu mortalitate mare și sechele se datoresc infecțiilor produse de virusurile EEE, encefalitei de Saint-Louis, WEE, encefalitei japoneze B sau a celei ruse de primăvară—vară. Evoluție benignă și sechele moderate sînt înregistrate după infecții cu VEE, cele din grupul California, v. louping ill, uneori v. Tahyna.

Pentru zona temperată europeană și asiatică, în care se încadrează și țara noastră, cele mai importante sînt arbovirozele transmise prin căpușe și manifestate prin febre hemoragice (Omsk, Crimeea—Congo) sau encefalite (rusă de primăvară—vară, scoțiană louping ill, bifazică de Europa Centrală). De remarcat că aceste virusuri pot fi transmise descendenților transovarian de către căpușe, în acest fel căpușele devenind rezervor natural. Prin intermediul căpușelor virusul poate ajunge la unele animale domestice (capră, vacă) care îl elimină prin lapte. Se creează deci o modalitate de transmitere la om, chiar în lipsa vectorului. În bazinul mediteranean, ca și în țara noastră, s-au semnalat cazuri de febră papatassi, iar în unele țări europene febre cu artralgii datorate infecției cu v. Tahyna.

După infecție se instalează de obicei, o imunitate durabilă, în general de tip. Denga hemoragică din Asia de Sud-Est; se apreciază a se datora unei reacții de hipersensibilitate ca urmare a unei a doua infecții cu un alt tip de virus denga.

Profilaxia specifică a febrei galbene, obligatorie pentru cei care călătoresc în țări endemice, se face cu un vaccin conținînd virus viu atenuat (tulpina 17 D). S-au mai aplicat vaccinuri la animale, în special pentru profilaxia encefalitelor ecvine.

4.18.2. ARENAVIRIDAE

Cuprinde virusuri ARN, monocatenare, sferice, învelite, cu simetrie elicoidală și diametru de aproximativ 110 nm (50—300 nm). În virioni se observă granule dense de 20 nm ce nu pot fi deosebite de ribozomii celulari. Virusul prototip, cel al choriomeningitei limfocitare, este universal răspîndit, avînd ca rezervor șoarecele de casă. Prin contactul cu acesta sau alimente contaminate, are loc infecția umană, manifestată de obicei prin febră, cefalee, oboseală (semne de gripă ușoară), care dispar în cîteva zile; s-au semnalat și meningite sau meningoencefalite.

Dintre celelalte virusuri ale familiei, trebuie semnalate v. Lassa (Africa), v. Junin (Argentina), v. Machupo (Bolivia), agenți etiologici ai unor febre hemoragice grave. Deși nu s-a putut dovedi transmisia prin intermediul insectelor, ci numai cea interumană, existența unor rezervoare animale, distribuția geografică ca și formele clinice grave, au făcut pe mulți autori să le încadreze în grupul arbovirusurilor.

Scanned with OKEN Scanner

4.19. HEPATITELE VIRALE

Hepatitele pot fi cauzate de numeroşi factori infecţioşi şi neinfecţioşi. Dintre agenţii patogeni de natură infecţioasă, s-au detaşat în mod deosebit virusurile hepatitelor „clasice" A şi B. Mai recent a fost creat şi grupul hepatitelor „non A — non B", ce apare mai cu seamă după transfuzii şi în a căror etiologie par să fie incriminate virusuri încă necaracterizate.

Virusul hepatitei A *(HAV)* s-a evidenţiat (1973) prin imunoelectronomicroscopie în fecalele bolnavilor. Se prezintă ca particule sferice cu diametrul de 27 nm, simetrie cubică, neînvelite, conţinînd ARN. Se inactivează prin autoclavare, fierbere, iradiere cu raze ultraviolete, tratare cu formol şi cloramină; rezistă 30 min la 56°C, tratare cu eter şi la un pH acid.

Virusul nu a fost deocamdată încadrat definitiv în nici una din familiile cunoscute. Ţinînd cont însă de faptul că s-au evidenţiat trei polipeptide majore asemănătoare celor ale enterovirusurilor ca morfologie şi structură, se presupune că ar aparţine familiei *Picornaviridae.*

HAV nu a putut fi cultivat pe sisteme celulare obişnuite. În ultimii ani s-au obţinut rezultate mulţumitoare pe culturi renale de marmosetă sau rinichi fetal de maimuţă Rhesus, dar numai după inocularea prealabilă a produsului patologic la marmosete.

Virusul hepatitei B *(HBV),* de asemeni neclasificat, este prezent în serul bolnavilor sub trei aspecte morfologice (fig. 4.22):

a. particule sferice mici, cu diametru de 22 nm;

b. forme filamentoase cu lungime de 200 nm şi diametru de 22 nm;

c. particule Dane, sferice, cu diametru de 45 nm, avînd un sîmbure (core) de 27 nm în care s-au evidenţiat ADN dublu catenar şi o ADN polimerază ADN dependentă.

Particulele Dane reprezintă de fapt virusul; celelalte forme ar fi componente de suprafaţă, sintetizate în exces şi agregate spontan.

La HBV s-au descris trei antigene care induc formare de anticorpi specifici:

a. antigenul de suprafaţă (Ag HBs) cunoscut şi ca Ag Australia, reprezentat de învelişul particulei Dane, prezent şi la celelalte două forme morfologice. Are o specifitate antigenică *a,* comună tuturor serotipurilor şi două seturi de determinanţi antigenici care se exclud reciproc *(d* sau *y; w* sau *r).* În raport cu distribuţia lor, rezultă patru subtipuri majore: *adw, adr, ayw, ayr;*

b. antigenul sîmburelui (AgHBc), identic la toate virusurile hepatitei B;

c. antigenul ce pare a fi legat de ADN polimerază (AgHBe) şi a cărui prezenţă în sînge ar constitui indicatorul de infectivitate.

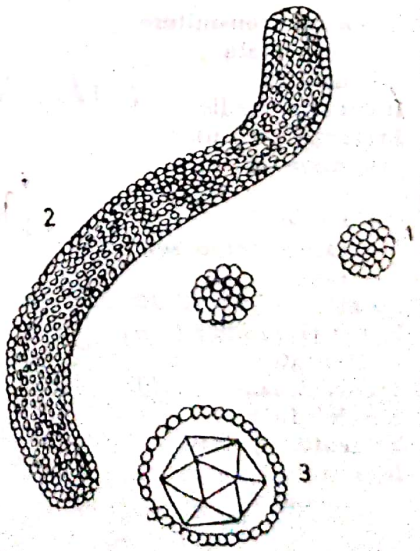


Fig. 4.22. **Aspecte morfologice ale virusului hepatitic B:**
1 — particule sferice (diametrul 22 nm); 2 — forme filamentoase (lungime de 20 nm şi diametru de 22 nm); 3 — particule Dane (după E. Jawetz şi colab.).

Scanned with OKEN Scanner

Virusul rămîne infecţios după 4 ore de încălzire la 60°C, tratare cu beta-propiolactonă sau iradiere prin raze ultraviolete. Infectivitatea se pierde însă în urma fierberii timp de 10 min, dar cu păstrarea antigenităţii HBs. Antigenul de suprafaţă este de asemeni stabil la un *pH* acid (2,4) peste 6 ore ca şi în urma iradierii cu raze ultraviolete a plasmei sau altor produse de sînge.

HBV nu s-a putut cultiva. Cimpanzeii fac uneori forme subclinice, iar maimuţele Rhesus pot fi de asemeni infectate, cu rezultate variabile. Alte animale de laborator (iepuri, cobai) nu se îmbolnăvesc, dar pot fi utilizate pentru producerea de Ac specifici.

HAV pătrunde în organism, mai ales, pe cale digestivă. După multiplicarea în epiteliul intestinal difuzează prin sînge, avînd ca organ ţintă ficatul. HBV se transmite, de obicei, prin inoculare, nefiind însă excluse şi alte mecanisme; şi în acest caz virusul se localizează la nivelul ficatului. Deşi simptomatologia este, în general, asemănătoare (febră, greţuri, anorexie, icter etc.), în cazul hepatitei B s-au descris forme clinice mai grave (hepatita cronică), cu decese, precum şi manifestări extrahepatice (urticarie, erupţii cutanate, artralgii, glomerulonefrite). Leziunile celulelor hepatice din formele cronice, evidenţiate prin biopsie, s-ar explica prin citoliza dependentă de Ac şi C′ sau intervenţia efectorilor imunităţii mediate celular. La aceasta se adaugă persistenţa virusului (infecţie persistentă cronică). Manifestările extrahepatice sînt cauzate probabil de complexele Ag—Ac circulante, care se depun la nivelul organelor respective.

Formele anicterice sînt frecvent întîlnite, mai ales, în hepatita B. Unele caracteristici ale hepatitelor A şi B sînt prezentate în tabelul 4.31.

Tabel 4.31

Principalele caracteristici clinice şi epidemiologice ale hepatitelor A şi B

	Hepatita A	Hepatita B
Calea de transmitere		
— principală	digestivă	parenterală
— alte căi	parenterală	digestivă, salivă, sexuală
Incubaţia medie	30 zile (15—45)	90 zile (45—180)
Prezenţa virusului		
— sînge	sfîrşitul incubaţiei, faza acută	incubaţie, faza acută, persistă luni—ani
— fecale	incubaţie, faza acută	rareori prezent
— urină, lichid seminal	?	rareori prezent
— salivă	?	deseori prezent
Debut	brusc	insidios
Hepatită cronică	rară	5—10%
Mortalitate	scăzută	1—5%
Transaminaze crescute	1—3 săptămîni	1—6 luni (uneori mai mult)
Nivelul IgM	crescut	normal, uşor crescut
Prezenţa Ag HB	nu	da
Imunitate		
— omologă	da	da
— heterologă	nu	nu
— durata	probabil toată viaţa	probabil toată viaţa
Profilaxia cu Ig (gamaglobulină) standard	previne icterul	oarecare efect cu Ig hiperimune
Vîrsta cea mai receptivă	copii, adulţi tineri	toate vîrstele
Sezonalitate	incidenţa maximă toamna	tot anul

Scanned with OKEN Scanner

În urma infecției se instalează imunitatea, probabil de lungă durată, specifică de tip. Nu există protecție încrucișată după îmbolnăvirile produse de virusurile A, B, non A — non B. Infecția cu un virus B conferă însă rezistență față de celelalte subtipuri (adw, adr, ayw, ayr), datorită antigenului comun „a". Anticorpii induși de AgHBc apar devreme și persistă atît timp cît este sintetizat antigenul; scad repede după vindecare. În schimb cei anti-HBs sînt produși mai tîrziu, dar se mențin multă vreme, fiind indicatori ai trecerii prin boală și ai imunității umorale.

Hepatita A evoluează frecvent la copii și tineri, cu incidența maximă la 5—25 ani. Mecanismul principal de transmitere este fecal-oral (contact direct, apă și alimente contaminate); calea parenterală a fost rareori semnalată. Epidemiile apar mai ales toamna, în colectivități; au un caracter exploziv în cazul transmiterii prin apă sau alimente.

Caracteristicile epidemiologice ale hepatitei B sînt dominate de existența stării de purtător, a cărei durată poate varia de la luni la ani. Virusul se transmite îndeosebi pe cale parenterală (inoculare de sînge sau derivate, seringi și ace insuficient sterilizate). Această modalitate este admisă și pentru hepatitele non A — non B. Ținînd cont de faptul că pentru producerea infecției cu HBV sînt necesare cantități minime de virus, un singur purtător poate contamina întregul lot de plasmă preparat de la mulți donatori. Se admite posibilitatea transmisiei și pe alte căi, deoarece AgHBs a fost decelat în salivă, secreție faringiană, fecale, spermă. Hepatita B evoluează sporadic, independent de vîrstă și în orice sezon.

Profilaxia specifică a hepatitei A se realizează prin administrarea de gamaglobuline, în prima săptămînă după contactul infectant (0,02 ml/kg. corp). Hepatita B a putut fi prevenită în unele cazuri cu gamaglobulina hiperimună. S-au obținut rezultate preliminare bune cu vaccinuri experimentale preparate din AgHBs.

4.20. ONCOGENEZA VIRALĂ

4.20.1. GENERALITĂȚI

Originea virală a unor tumori la animale a fost pusă în discuție de la începutul acestui secol. Ellerman și Bang, în 1908, au demonstrat că leucemia spontană a păsărilor poate fi transmisă la animalele din aceeași specie prin filtrate acelulare, iar Rous în 1911 a găsit că o tumoră solidă — sarcomul păsărilor — poate fi transmisă în mod asemănător. Interesul și acumularea datelor rezultate din cercetarea științifică au avut o dezvoltare lentă în raport cu importanța problemei. Anul 1956 poate fi privit de aceea ca un moment de cotitură în impulsionarea cercetării relației virusuri-tumori. Este anul în care se ilustrează că virusul polioamelor, din familia *Papovaviridae*, se găsește frecvent în crescătoriile de șoareci, producînd infecții inaparente. În anumite condiții este însă oncogen la șoareci, ca și experimental la alte animale de

Scanned with OKEN Scanner

laborator, putînd fi cultivat și titrat *in vitro* (culturi de celule). Ulterior s-a văzut că un virus din aceeași familie stă la originea unor tumori benigne ale omului — verucile umane, — iar virusul SV_{40} — virus simian vacuolizant, care la maimuță se găsește în infecții inaparente, poate produce tumori cînd este inoculat la alte animale. În mod asemănător unele adenovirusuri umane inoculate la hamster și șoarecele nou-născut induc tumori maligne. Aceste date, ca și cele rezultate din cercetările din ultima perioadă, au adus cîteva conturări importante în problema relației dintre virusuri și tumori. La multe specii animale s-a dovedit că apariția spontană a unor tumori este neîndoielnic indusă viral. Multe, dacă nu toate din aceste virusuri, au răspîndire largă în lumea animală, de cele mai multe ori parazitarea organismului gazdă, fiind însoțită de manifestări patologice exprimate clinic, ele încadrîndu-se în caracteristicile generale ale *infecției persistente*. Cancerul, ca manifestare patologică, poate să apară în condițiile unui astfel de tip de infecție, dezvoltîndu-se numai după o *lungă perioadă* de coexistență echilibrată virus-organism gazdă. La oncornavirusuri în tot timpul infecției celulele infectate sînt producătoare de virusuri. Pentru alte virusuri (virusuri cu ADN), nu se pot evidenția virionii în celulele tumorale. Instalarea tumorilor este de cele mai multe ori condiționată de factori multipli, între care factorii genetici de gazdă și procesele imune joacă un rol important.

Procesul de oncogeneză poate fi cercetat *in vitro*, pe culturi de celule. Infectarea celulelor cu un virus oncogen duce la modificări profunde ale acestora: *transformarea tumorală celulară*. Aceasta poate să apară și spontan, fără o infectare experimentală a culturii de celule, în urma unei cultivări prelungite sau prin acțiunea unor factori mutageni.

Virusurile capabile să inducă tumori sînt prezente în multe familii de virusuri cu ADN; virusurile cu ARN cunoscute pînă în prezent fac parte dintr-o singură familie — *Retroviridae*. Ceea ce constituie procesul unitar pentru toate aceste virusuri este modalitatea lor de persistență în celulă, indiferent dacă sînt virusuri cu ADN sau cu ARN, sub formă de genom viral complet sau parțial, ca moleculă de *ADN viral*, integrată în cromozomii celulei transformate sau infectate. Pentru transformarea tumorală a celulei nu este necesară exprimarea întregii informații din genomul viral. Similaritățile cu lizogenia prin bacteriofagi temperați la bacterii a făcut să se considere că acidul nucleic viral este integrat în genomul celular sub formă de provirus (analog cu profagul).

Pînă în prezent nu s-au adus dovezi definitive pentru etiologia virală a unui cancer uman, dar sînt unele tumori benigne ca verucile sau molluscum contagiosum, de origine cert virală. Cercetările experimentale *in vitro* și *in vivo* pe animal, metodele de studiu ale tumorilor maligne animale, viral induse, descifrările moleculare ale relației dintre virusuri și tumori, se constituie în metode de lucru nu numai utile, dar și necesare pentru înțelegerea oncogenezei la om. Este puțin probabil ca în lumea animală, specia umană să constituie o excepție și să fie singura la care virusurile să nu fie, direct sau într-o condiționare multifactorială, oncogene.

Scanned with OKEN Scanner

21—56

4.20.2. CELULA TRANSFORMATĂ TUMORAL

S-a observat că virusurile care pot declanșa tumori la animale au și capacitatea de a produce transformarea celulară. Această observație a avut două consecințe importante:

— s-a ajuns la conturarea conceptuală că dezvoltarea unei tumori este un proces ce are la bază o celulă transformată malign, care, dacă prin supraveghere imună nu este eliminată din organism, se dezvoltă necontrolat, ducînd la apariția unui cancer;

— transformarea în culturi de celule s-a dovedit a fi un bun model pentru studiul molecular al evenimentelor implicate în oncogeneza virală, în condiții bine precizate și controlate.

Inocularea unui virus oncogen într-o cultură de celule duce la apariția celulelor transformate, care au cîteva modificări în proprietățile lor de bază, modificări determinate genetic și în consecință transmise la generațiile descendente.

Testarea cea mai sigură a transformării real tumorale obținută într-un sistem *in vitro* constă în evidențierea proprietăților celulelor astfel modificate de a produce tumori, dacă sînt inoculate în animale izologe. Deoarece aceasta nu este totdeauna posibil, se folosesc criterii ce țin de modificările ereditare exprimate în fenotipul celular și care caracterizează celula transformată prin proprietățile din tabelul 4.32.

Tabel 4.32

Proprietățile caracteristice ale celulei transformate tumoral de virusuri

1. Modificări morfologice:
   — tendința spre forma rotundă, cu orientare întîmplătoare, dezordonată în cultură;
   — membrana pierde în mare măsură microfilamentele, dar prezintă microvili.
2. Potențial maxim de dezvoltare:
   — formează colonii prin dispunere tridimensională *(— microtumorete —)* datorită pierderii proprietății de inhibiție prin contact;
   — se dezvoltă în medii cu conținut redus de ser sanguin (cantități de 10 ori mai mici decît cele necesare la celulele normale);
   — se multiplică în pasagii succesive nelimitate în timp;
   — se dezvoltă sub formă de colonii în agar 0,5%, prin pierderea proprietății de ancorare.
3. Modificări în glicoproteinele și glicolipidele membranei citoplasmatice, cu reducerea componentei carbohidratice a glicolipidelor și pierderea unei molecule glicoproteice cu greutate moleculară mare:
   — producere crescută de mucopolizaharide;
   — sisteme de transport foarte active.
4. Apariția de noi antigene:
   — antigene de transformare celulară pe suprafața celulei:
   TSTA = Tumor Specific Transplantation Antigens;
   — antigene endocelulare (antigene T).
5. Modificări (alterări) cromozomiale de amploare variată.
6. Prezența genomului viral (în totalitate sau părți din el) în cromozomii celulari

Făcînd o comparație între virusurile cu ARN și ADN s-a constatat că primele au o mare eficiență de transformare, pe cînd la cele cu ADN, transformarea se produce mai dificil, celula trecînd de cele mai multe ori printr-o etapă intermediară și reversibilă de celulă premalignă. De asemenea, în transformarea cu aceste virusuri numai o mică parte din

Scanned with OKEN Scanner

populația de celule suferă acest proces. Substanțele mutagene și cancerigene, cum sînt analogii de baze ADN (5-iodo-2-dioxiuridina), hidrocarburile policiclice (de exemplu, benzpirenul), razele X și altele, cresc rata de transformare prin virusurile oncogene, probabil prin favorizarea integrării ADN-ului viral în cel cromozomial al celulei gazdă.

4.20.3. VIRUSURI ONCOGENE LA ANIMALE

Unele virusuri oncogene produc tumori la specia gazdă ca o consecință a infecției naturale, altele sînt oncogene numai dacă în mod experimental se infectează o altă specie decît cea care reprezintă gazda, iar altele pot fi oncogene în ambele condiții. Ca toate virusurile, și cele oncogene pot fi grupate după tipul de acid nucleic din care sînt constituite — ADN sau ARN.

I. **Virusurile oncogene cu ADN** fac parte (tabelul 4.33) din familiile *Papovaviridae, Adenoviridae, Herpetoviridae* și *Poxviridae*. Unele virusuri pot produce tumori spontane la specia sau speciile infectate natural (virusurile papiloamelor, cele herpetoanimale), altele numai experimental, fie prin inoculare la animale nou-născute din aceeași specie (virusul polioamelor) sau din altă specie (SV_{40}, Adeno). Multe din aceste tumori sînt benigne (papiloame, inclusiv verucile umane, polioame, fibromul iepurelui), cu posibilitatea de a se maligniza. Altele sînt tumori maligne (sarcoame, limfoame etc.). Majoritatea acestor virusuri pot induce transformarea *in vitro* celulelor din aceeași specie sau mai degrabă a celor provenite de la alte specii, decît cele natural infectate. Un loc important pentru datele ce pot fi folosite în cunoașterea oncogenezei umane îl ocupă virusurile animale din *Herpetoviridae* și mai ales, virusul Marek, care produce neurolimfomatoza păsărilor. Dintr-o variantă cu virulență diminuată a acestui virus s-a preparat un vaccin. Imunizarea păsărilor cu acest vaccin a prevenit apariția tumorilor, ceea ce constituie un argument evident pentru determinismul viral al neurolimfomatozei păsărilor. Dintre virusurile din *Papovaviridae,* au atras atenția virusurile asemănătoare cu SV_{40}, izolate în cazuri de leucoencefalopatie multifocală sau din urină de la subiecți tratați cu imunosupresoare: virusurile JC, BK ș.a. Ele induc transformare tumorală în celule de hamster și tumori maligne prin inoculare la același animal. Virusurile determină primoinfecție la copii între 5—15 ani, 70% din serurile acestor subiecți prezentînd anticorpi. Este posibil un rol al acestor virusuri în tumori umane, mai ales ale SNC.

Sînt necesare cîteva considerații asupra transformării tumorale cu virusuri Papova, folosite ca model pentru virusurile cu ADN. Aceste virusuri aleg între două alternative: atunci cînd infectează celule permisive, cum sînt celulele embrionare umane pentru virusul polioma, dau o infecție productivă cu efect citocid și eliberare de virioni. Dacă infectează celulele nepermisive, cum sînt pentru același virus celulele embrionare de hamster, produc transformare tumorală, fără prezență de virioni.

Procesul de transformare este puțin eficient. Astfel în cazul fibroblaștilor de hamster, sistemul cel mai sensibil pentru transformarea cu virus polioma, o unitate transformantă este echivalentă cu 1 milion de

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.33

Principalele virusuri oncogene cu ADN

Familia	Reprezentanți	Gazdă	Tumori la specia parazitată natural	Tumori induse experimental	Transformare *in vitro*
Papovaviridae	V. papiloamelor	om	Veruci și papiloame la om	nu	—
		iepure	papiloame la iepure	șoarece nou-născut	—
		bovine	papiloame la bovine	bovine	bovine
	V. polioamelor	șoarece	nu	șoarece, hamster, alte rozătoare	șoarece, șobolan, hamster
	V. SV40 (vacuolizant)	maimuță	nu	hamster, șoarece, nou-născut (sarcom)	rozătoare, om
	V. JC și BK	om	?	hamster	rozătoare
Adenoviridae	Tipurile umane 3, 7, 11, 12, 14, 16, 18, 21, 31	om	nu	hamster, șoarece nou-născut (sarcoame)	hamster, șobolan, om
	Tipuri simiene	maimuță	nu	idem	idem
Herpetoviridae	V. Marek	păsări	neurolimfoame	păsări	—
	V. Lucké	broască leopard	carcinom	broască	—
	H. sylvilagus (V. Hinze)	iepure	nu	iepure (limfoame)	—
	H. saimiri	maimuță	limfoame	primate	—
Poxviridae	V. molluscum contagiosum	om	molluscum	—	—

Scanned with OKEN Scanner

virioni, ceea ce presupune că numai una din aceste particule virionale este efectivă în procesul de transformare. Tratarea celulelor cu substanţe chimice cancerigene favorizează printr-un mecanism necunoscut transformarea celulară cu unele papovavirusuri. Evenimentele iniţiale în infecţia productivă şi transformantă sînt comune. Se pare însă că ulterior intervine o alegere alternativă a căilor care duc la replicare şi formare de virioni completi, sau a căilor care duc la transformare; celulele transformate nu conţin antigene capsidale şi nici acid nucleic infecţios. În aceste celule ADN-ul viral este covalent legat de cromozomul celular ca provirus. Pot fi integrate 1—3, uneori chiar 20 de genoame virale, în cromozomii unei celule.

Transformarea celulară cu papovavirusuri este acompaniată de apariţia, aşa cum s-a văzut, de noi antigene. Pentru antigenele TSTA care apar în membrana celulară, nu există nici un argument pentru sinteza lor prin informaţie virală.

Studiile de clonare a moleculei de ADN din SV_{40} prin fragmentare cu enzime de restricţie, utilizarea virusurilor defective, inclusiv a mutantelor TS, au putut evidenţia cîteva fenomene importante. A fost astfel posibilă întocmirea unei hărţi a genomului viral (fig. 4.23). Numai genele din regiunea (programul) precoce sînt necesare pentru transformare. Fragmente de ADN lipsite de mari părţi din regiunea (programul) tardivă îşi păstrează proprietatea transformantă. Funcţia genei A poate fi implicată în integrarea ADN-ului viral în cromozomii celulari, avînd un rol esenţial în iniţierea şi menţinerea transformării. Gena A codifică antigenul T (tumoral) prezent în nucleul celulelor înainte de apariţia proteinelor de structură virională. Antigenul T este o fosfoproteină cu funcţie de proteinkinază, ipotetic şi de ATP-ază. Deşi indispensabilă, funcţia precisă a antigenului T în transformare nu este încă stabilită. În celula transformată se găseşte, de asemenea, un antigen cu moleculă mai mică, antigenul mic t, care pare să intervină în stimularea diviziunii celulare, treaptă necesară transformării.

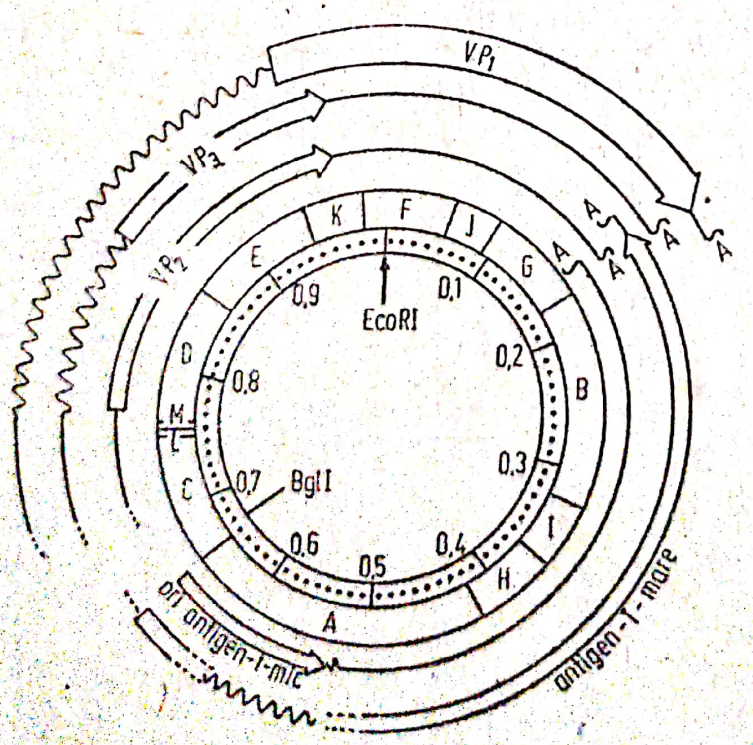


Fig. 4.23. Harta genomului virusului SV_{40}.

Produşii genei „A" reprezintă antigenele T şi t (după E. Jawetz, J. L. Melnick, E. A. Adelberg).

II. **Virusurile oncogene cu ARN,** asemănătoare morfologic, structural și prin proprietățile principale biologice, sînt încadrate în subfamilia *Oncornavirinae* (virusuri oncogene cu ARN), din familia *Retroviridae*. S-a stabilit că unele din aceste virusuri produc natural tumori, mai ales, de tip leucoză-limfomatoză, uneori sarcoame la păsări și la mai multe specii de mamifere. Aceste virusuri au un virion de 90—120 nm cu o structură complexă. Virionul matur constă dintr-un sîmbure central, electrono dens, cu diametrul de 55 nm, învelit cu o anvelopă structurată asemănător cu cea a virusului gripal, inclusiv cu prezența unor proeminențe. Între sîmbure și anvelopă se găsește o membrană proteică internă (fig. 4.24). Se remarcă unele variații în morfologia virionului

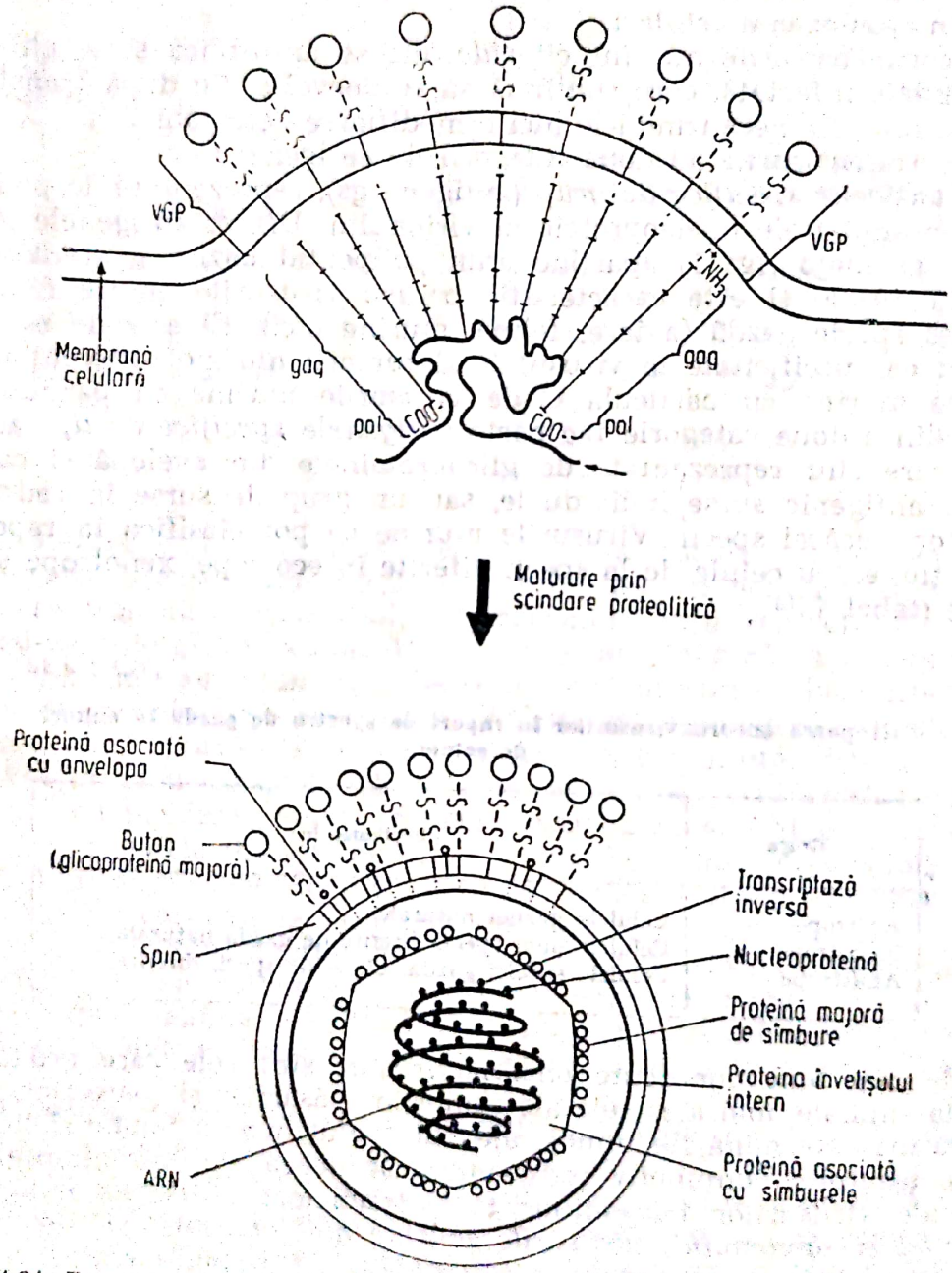


Fig. 4.24. Prezentarea schematică a structurării și asamblării tipului C de Oncornavirus.
Componentele anvelopei virale se inseră în membrana celulară în poziția în care se va produce înmugurirea. Moleculele precursoare „gAg" neclivate, care conțin polipeptidele virale interne, migrează în această poziție — un capăt al moleculei se leagă de complexul anvelopei virale, celălalt de ARN-ul viral. Enzimele proteolitice clivează precursorii pentru a genera polipeptidele virale care se autoasamblează pentru a forma substructurile virale.

Scanned with OKEN Scanner

matur extracelular, distingîndu-se astfel: particula C, în care sîmburele este situat central și care se întîlnește în majoritatea tumorilor, particula B, în care simburele are o poziție excentrică și este caracteristică virusului tumorii glandei mamare de șoarece și, particula D, cu proprietăți intermediare între particulele precedente, găsită în unele tumori și țesuturi ale primatelor. La acestea să adăugăm particula A, prezentă în interiorul cisternelor reticulului endoplasmatic din celulele infectate, la care sîmburele central este posibil lipsit de acidul nucleic și în consecință este neinfectantă.

Replicarea virusurilor din această familie este particulară și ea explică în mare parte modalitatea prin care un genom viral cu ARN poate induce transformarea celulară tumorală, prin integrare ca moleculă de ADN în cromozomii celulari.

Oncornavirusurile nu sînt *citocide*, ele se multiplică și se eliberează din celulele infectate, care continuă să se dezvolte, fie după transformarea acestora, fie necauzîndu-le nici o modificare detectabilă.

Oncornavirusurile au două categorii de antigene:

— *antigene specifice de grup* (antigene gs), reprezentate de polipeptidele din sîmburele nucleoproteic al virionului. Dintre antigenele gs, antigenul gs major (gs 1) aparține unui polipeptid bazic cu greutate moleculară 30.000 și este caracteristic pentru virusurile de tip C dintr-o anumită specie gazdă (aviare, feline, murine etc.). El este de asemenea distinct ca specificitate la virusul B al tumorii murine (diferențiază virusurile murine cu particulă C de virusurile murine cu particulă B);

— din a doua categorie fac parte *antigenele specifice de tip* sau *subgrup*, care sînt reprezentate de glicoproteinele din anvelopă și caracterizează antigenic surse individuale, sau un grup de surse în cadrul virusurilor fiecărei specii. Virusurile murine se pot clasifica în raport cu interacțiunea cu celule de la specii diferite în ecotrope, xenotrope și amfitrope (tabel 4.34).

Tabel 4.34

Gruparea oncornavirusurilor în raport de spectru de gazdă în culturi de celule

Grupa	Replicarea în:
Ecotrope	Celulele gazdei naturale
Xenotrope	Celulele unor specii diferite de gazda naturală
Amfitrope	Celulele speciei gazdă, cît și de specii diferite

Cele mai bine cunoscute oncornavirusuri sînt cele care produc tumori la animale, mai ales cele ale tumorilor păsărilor și șoarecilor. Aceste virusuri determină fie tumori ale sistemului hematopoietic și limfatic, fie ale țesutului conjunctiv (sarcoame). De aceea ele sînt numite complexe ale virusurilor leucemiilor și sarcoamelor: *virusurile aviare ale leucemiei și sarcomului, virusurile murine ale leucemiei și sarcomului, virusurile feline ale leucemiei și sarcomului ș.a.* (tabel 4.35). La acestea se adaugă virusul glandei mamare la șoarece (particula B) și virusul izolat dintr-o tumoră de glandă mamară de la Rhesus, oncorna virus de tip D. Oncogeneza prin aceste virusuri este rezultatul unei interacțiuni

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 4.35

Principalele oncornavirusuri care produc tumori la animale

Virusul	Tipul de tumoră	Apariția naturală la specia gazdă	Specii la care apare experimental tumora	Transformare celulară	Tipul de virus
Complexul aviar	leucemie	da	găini și alte păsări	păsări	C
	sarcom	da	păsări, rozătoare, maimuță	mai multe specii	C
Complexul murin	leucemie	da	șoarece, șobolan, hamster	șoarece	C
	sarcom	nu	idem	șoarece, șobolan, hamster	C
V. tumorii mamare la șoarece	tumoară mamară	da	șoarece		B
Complexul felin	leucemie	da	pisică		
	sarcom	da	pisică, cîine, iepure, maimuță	pisică, cîine, maimuță, om	C
V. limfomului bovin	limfom	da			C
V. sarcomului maimuței lînoase	sarcom	da	maimuță	maimuță	C
V. leucemiei gibonului	leucemie	da			C
V. carcinomului mamar al maimuțelor	carcinom			maimuță	D

complexe între diferitele tipuri de virusuri și factori dependenți de gazdă, între care sînt implicați în primul rînd cei genetici. În general infecția se transmite congenital, sau orizontal (prin contact) la animalele nou-născute și ea rămîne într-o stare latentă pînă la o vîrstă mai înaintată, la care apar tumorile. Se poate apoi preciza că la multe specii de animale, neoplasmele sistemului limfatic și hematogen, secondate de sarcoame, sînt tipurile de tumori mai frecvent întîlnite. Este de aceea interesant de făcut analogia că și la oamenii tineri acestea sînt tipurile de tumori cu incidență mare. În specia umană la adulții cu vîrsta înaintată, carcinoamele (tumori de origine epitelială) sînt responsabile pentru cea mai mare parte din decesele prin cancer, situație întîlnită și la unele animale care ajung la vîrsta înaintată (cîini și cai). Și în aceste tumori este incriminată intervenția oncornavirusurilor. Oncogeneza prin oncornavirusuri se datorește unor evenimente de mare complexitate. Studiile experimentale cu diferite virusuri ale complexului leucemie-sarcom au arătat că există două categorii principale de oncornavirusuri C.

1. *Virusuri nedefective cu potențial oncogenic redus* sînt adeseori izolate de la animale cu limfoame sau leucemii. Ele se pot multiplica în multe tipuri de celule în organism sau *in vitro*, fără să producă transformare celulară și nu necesită un virus helper deoarece conțin toate genele necesare multiplicării. Unele din aceste virusuri pot fi prezente la multe specii ca provirusuri latente și pot fi activate, rezultînd producerea de virus infecțios care în mod obișnuit este neoncogen. Unele din aceste virusuri generează derivați oncogeni după recombinare cu virusuri latente din celulele pe care le infectează.

Scanned with OKEN Scanner

2. *Virusuri ale leucozei* sau *sarcomului*, de obicei *defective*, cu puternică activitate oncogenă, pot fi considerate ca provenind din prima categorie, conţinînd în genomul lor un fragment de material genetic celular, care le conferă o înaltă activitate oncogenă. În multe cazuri, încorporarea fragmentului celular este însoţită de pierderea unor gene virale esenţiale pentru replicare: virus defectiv. De aceea un astfel de virus necesită asocierea cu un virus helper (ajutător), care furnizează produşii genei/genelor absente la virusul defectiv.

Aceste virusuri aparţin virusurilor ce au fost numite *endogene*. S-a demonstrat că virusurile de tip C murine sînt practic prezente în celulele tuturor şoarecilor şi la toate celulele în culturi provenite de la aceste animale. Virusuri asemănătoare au fost evidenţiate şi la alte specii animale. Aceste virusuri sînt prezente ca molecule de ADN integrate în cromozomul celular, ca provirus, amintind starea de lizogenie de la bacterii. Ele se transmit vertical pe linia germinală. Pot fi induse, producînd virus infecţios în culturi de celule, fie spontan (rareori) sau prin inductori variaţi: raze X, analogi de nucleotide, inhibitori ai sintezei proteice, substanţe chimice mutagene sau cancerigene. Spre deosebire de acestea, provirusurile *exogene* sînt rezultatul unei transmisii verticale, şi se formează după infectarea celulelor somatice.

Principala diferenţă între provirusurile endogene şi exogene constă în faptul că cele endogene persistă în linia germinală şi sînt moştenite ca gene cu transmitere mendeliană, în timp ce cele exogene există numai în clonele celulare derivate dintr-o celulă somatică primară infectată.

Utilizarea experimentală a acestor virusuri a permis să se stabilească o hartă a genomului viral (fig. 4.25) şi a produşilor genici codificaţi de diferitele segmente. Aşa cum se vede, părţi diferite din genom sînt răspunzătoare de produşii care asigură replicarea virală şi de transformare. Secvenţele *src*, la virusul sarcomului aviar, constituie gena transformantă, deoarece deleţia acesteia este însoţită de apariţia de variante netransformante. Secvenţele *src* par să fie secvenţe reglatorii din genomul celular. Unele caractere ale transformării sînt cauzate direct şi sînt menţinute prin sinteza continuă a produsului *src*. El este o fosfoproteină de 60 000 daltoni (p 60). Proteina este prezentă în celulele normale (neinfectate). Ea se găseşte însă într-o cantitate de 50 ori mai mare în celulele transformate viral. Proteina p 60 funcţionează ca o protein-kinază, producînd în prezenţă de ATP fosforilarea altor proteine, fiind asociată cu membrana celulară. Fosforilarea unor proteine cu rol în reglarea dez-

	5' gag	pol	env	src	c	AA	A3'
Virusul	Proteine structurale majore ale simburelui	Polimeraza H-ARN-ază ADN endonuclează	Glicoproteine de anvelopă	Proteină (ele) transformantă	Regiunea constantă		
Avior	p19 p27 p12 p15	p90 p65 p32	gp85 gp37	$pp60^{src}$	?		
Murin	p15 p12 p30 p10	p84	gp70 $p15^{(E)}$	?	?		
Felin	p15 p12 p30 p10	?	gp7 $p15^{(E)}$	p65?	?		

Fig. 4.25. Harta genomului Oncornavirusurilor.

Produsul primei gene *gag* este o poliproteină care suferă scindări posttranscripţionale pentru a da proteinele majore ale simburelui. Gena *pol* codifică o proteină pleiotropică cu activitate de ADN — polimerază — ARN dependentă, H-ARN-ază şi ADN-endonuclează. Gena *env* codifică o poliproteină, care este sciudată şi glicozilată pentru a da glicoproteinele de anvelopă. Gena *src* codifică aşa-numitele proteine transformate, a căror prezenţă în celulă duce la transformarea tumorală, mai bine cunoscute la virusurile sarcomului păsărilor (greutate moleculară în mii).

Scanned with OKEN Scanner

voltării celulare, are ca rezultat transformarea malignă. Aceasta se poate explica prin diferențele de ordin cantitativ ale p 60 existente în celulele normale și cele transformate.

Pe baza considerentelor și mai ales datorită prezenței lor largi în culturi de celule și la diferite specii animale prezentate, s-a acordat oncornavirusurilor ipotetic un *rol biologic mai larg* decît cel redus la oncogeneză, fără însă ca dovezi evidente să sprijine această afirmație. Astfel, ele ar putea avea o funcție biologică în embriogeneză, în diferențierea și dezvoltarea normală celulară. În cursul vieții ar putea de asemeni să intervină în îmbătrînirea celulară și instalarea unor boli autoimune. Într-o ultimă intervenție controlată multifactorial, cel puțin unele din oncornavirusuri, mai ales cele ecotrope, pot să-și manifeste proprietatea oncogenă.

4.20.4. VIRUSURILE ȘI ONCOGENEZA UMANĂ

Nu s-a putut stabili cu totală certitudine etiologia virală în nici o tumoră malignă umană. Din relația virusuri-oncogeneză, atît de multiplu condiționată în cercetările pe animal, reiese cu claritate că sînt dificil de respectat postulatele lui Koch în stabilirea rolului virusurilor în inducerea tumorilor umane, din cauza dificultăților ce survin în manipularea experimentală.

Cu toate acestea, folosind datele obținute în cercetările la animale se poate presupune în stadiul actual determinismul viral în unele tumori umane.

Astfel, particulele virale de tip C au fost evidențiate prin microscopie electronică în celule sau în plasma bolnavilor cu leucemii, limfomul Hodgkin, limfosarcoame și sarcoame. Acelaș tip de particule virale au fost evidențiate în placenta umană, ca și în celule tumorale, presupunînd ca și la animale, o distribuție largă a oncornavirusurilor.

Virionii similari celor ai virusurilor tumorii glandei mamare la șoareci (particulă de tip B) ca și revers transcriptaza s-au găsit în cancerul mamar. La americance cu antecedente familiale pentru această tumoră, particulele de tip B și revers transcriptaza s-au evidențiat într-o proporție semnificativ mai mare, decît la femei fără antecedente familiare. De asemenea serurile femeilor cu cancer mamar neutralizează virusul tumorii mamare murine, fiind de asemenea posibilă hibridarea specifică a ADN-ului sintetizat in vitro pe complexul ARN viral uman — revers transcriptază, cu ARN-ul virusului murin. Aceste date presupun cu multă probabilitate că un oncornavirus cu particula de tip B induce cancerul de sîn.

În ultimii ani au atras atenția reprezentanți ai *familiei herpetoviridae* ca și candidați în oncogeneza umană.

Așa cum s-a văzut, infecția cu virusul herpes simplex de tip 2 poate fi considerată ca o boală venerică. Epidemiologic s-a evidențiat o corelație strînsă între infecția cu acest virus și cancerul uterin ca și titre ridicate de anticorpi antiherpetici la bolnave cu cancer sau cu stadii precanceroase de col uterin. În plus, titre ridicate de anticorpi față de antigene nevirionale induse de virus au fost găsite la paciente cu cancer uterin. Aceste date par să implice virusul herpetic de tip 2 în această tumoră.

Scanned with OKEN Scanner

Herpesvirus Epstein-Barr, agentul etiologic al mononucleozei infecțioase, producînd în copilărie infecții inaparente larg răspîndite, a fost evidențiat în limfomul Burkitt și carcinomul rinofaringian. Ambele tumori, deși cu o concentrare geografică a incidenței particulară (L. Burkitt la copii în Africa centrală, carcinomul nazofaringian la populația masculină chineză din Asia de Sud-Est), se întîlnesc cu o frecvență mai mică în toată lumea. Alături de evidențierea electronomicroscopică a virusului în țesuturile tumorale, date de serologie, cultivare a virusurilor și stabilirea prezenței genomului viral fie integrat în cromozomi, fie sub formă de molecule circulare (amintind plasmidele) în citoplasma celulelor tumorale, sînt argumente care susțin rolul cauzal al virusului în apariția acestor tumori. Pe de altă parte, faptul că limfocitele B sînt singurele celule în care se multiplică virusul și că limfocitele de la subiecți seropozitivi (cu anticorpi antivirali) pot fi menținute în cultură în pasaje prelungite, cu prezența virusului în celule, ridică dubii asupra semnificației prezenței virusului în țesuturile tumorale: este agent cauzal sau suprainfectant al celulelor tumorale.

În ultima vreme studiile epidemiologice au arătat că există o corelație semnificativă între frecvența cu care în diferite zone geografice se înregistrează infecția persistentă cronică cu virusul hepatitei B și incidența carcinomului hepatocelular. Virusul poate fi oncogen, transformînd celulele hepatice infectate. În acest sens pledează și datele recente care au arătat că ADN-ul viral se găsește integrat în genomul celulelor din carcinomul hepatic. Argumente suplimentare au adus observațiile făcute pe un model experimental natural, *Marmota monax,* care este infectată cu un virus al hepatitei, înrudit cu virusul hepatitei B. S-a stabilit că la acest animal există o proporție ridicată de purtători cronici, similară cu cea găsită la om în zonele puternic endemice prin hepatita B. S-a putut de asemenea evidenția o selecție directă la acest animal între infecția cu virusul marmotei, hepatita cronică și carcinomul hepatic. Rolul virusului hepatitei B în carcinomul hepatocelular va putea fi definitiv confirmat prin rezultatul pe care vaccinul care și-a dovedit eficiența (se preconizează ca în următorii ani să poată avea o utilizare generală), îl va avea prin reducerea morbidității prin hepatita B, în scăderea incidenței tumorii.

Pentru stabilirea rolului virusurilor în oncogeneză la om, vor aduce în continuare informații importante datele furnizate de modelele experimentale la animale, ca și studiile imunologice și genetice. De asemenea se vor putea, pe aceste baze, preciza relațiile dintre factorii cancerigeni și virusuri.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Bach J. Fr. *Immunologie.* Flammarion Médicine-Sciences, 1976.
2. Baciu I. *Fiziologie.* Ed. 2. Editura didactică și pedagogică, București, 1977.
3. Badenski Gh. *Noțiuni de genetică și biologie moleculară bacteriană.* În „Biologia moleculară și medicina modernă" (sub redacția O. FODOR), 236—247. Editura medicală, București, 1969.
4. Barksdale L., Kim K. S. *Mycobacterium.* Bact. Rev. 41 (1), 217—372, 1977.
5. Bârzu O. și col. *Curs de biochimie medicală,* vol. I și II. Litografia IMF Cluj-Napoca, 1975, 1977.
6. Bellanti J. A. *Immunology.* Saunders Comp. Philadelphia, 1971.
7. Benacerraf B., Paul W. E., Sreen I. *Hapten carriers relationships.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 169, 93—104, 1970.
8. Benga Gh. *Curs de biologie celulară.* Lit. I.M.F. Cluj-Napoca, 1980.
9. Berg C. M., Berg D. E. *Bacterial Transposons.* În Microbiology 1981. Ed. D. Schlessinger, 107—146. Am. Soc. for Microbiology, Washington D. C., 1981.
10. Bîlbie V., Zamfirescu M. și col. *Actualitate și perspectivă în imunoprofilaxia specifică a bolilor transmisibile. Viața medicală.* 21, 6, 255—258, 1974.
11. Brock Th. D. *Biology of Microorganisms.* Ed. 3. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1979.
12. Bryant N. J. *Laboratory Immunology and Serology.* W. B. Saunders Comp. Philadelphia, 1978.
13. Carpenter P. L. *Immunology and Serology.* Ed. 3. Saunders Comp. London, 1975.
14. Cernuh A. M. *Vospalenie.* Mediția. Moscova, 1979.
15. Clewell D. B. *Plasmids, drug resistence and gene transfer in the genus Streptococcus.* Microbiol. Rev. 45, 409—436, 1981.
16. Clowes R. C. *Molecular structure of bacterial plasmides.* Bact. Rev. 36, 361—405, 1972.
17. Collier R. J. *Genetic approaches to structure and activity in ADP-ribosylating exotoxins.* In Microbiology, Ed. D. Schlessinger, 242—245, ASM Washington, 1979.
18. Costerton J. W., Ingram J. M., Cheng K. J. *Structure and function of the cell envelope of gram-negative Bacteria. Bact. Rev.* 38, 87—110, 1974.
19. Daguet G. L. *Elements d'Immunologie Médicale.* Flammarion Médicine-Sciences. Paris, 1972.
20. Dannenbery A. M. *Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of Tuberculosis.* Bact. Rev. 32, 85—101, 1968.
21. Davis B. D., Dulbecco R. și col. *Microbiology.* Ed. 3, Harper Intern. Edit., 1980.
22. Dills S. S., Apperson A. și col. *Carbohidrate transport in Bacteria. Microbiol. Rev.* 44, 385—418, 1980.
23. Di Rienzo J. M., Nakamura K., Inouye M. *The outer membrane*

Scanned with OKEN Scanner

proteins of gram-negative Bacteria: biosynthesis, asembly and functions. Ann. Rev. Biochi. 47, 481—533, 1978.
24. Dougherty R. M., Bradley M. K. *Oncogenicity of human Papova viruses.* Microbiology. Ed. Schlessinger. 424—426. ASM Washington, 1978.
25. Drăgănescu N., Cajal. N. *Encefalite și encefalopatii virale cu evoluție lentă.* Editura Academiei R.S.R., București, 1974.
26. Dragomirescu M. și col. *Patogenia infecțiilor.* Editura Facla, Timișoara, 1980.
27. Duane C. Y., Raymond C. V. *Ferredoxins and flavodoxins of bacteria.* Ann. Rev. Microb. 26, 139—162, 1972.
28. Dubos R. J., Hirsch J. G. *Bacterial and Mycotic Infections of Man.* Lippincott Comp., 1965.
29. Duca E. Duca M., Furtunescu G. *Microbiologie medicală.* Ed. 2. Editura didactică și pedagogică, București, 1979.
30. Duca M. *Inframicrobiologie.* Editura didactică și pedagogică, București, 1965.
31. Elias M. I., Bornuz M. și col. *Parazitologie medicală.* Editura didactică și pedagogică, București, 1981.
32. Enquist L. W., Weisberg R. A. *Bacteriophage Lambda site-specific recombination.* In Microbiology. Ed. D. Schlessinger, 50—55, ASM Washington, 1981.
33. Fine Gold S. M., Martin W. J., Scott E. G. *Bailey and Scott's Diagnostic microbiology.* Fifth Ed., The C. V. Mosby Comp. Saint Louis, 1978.
34. Fodor O., Dumitrașcu. D. *Enterocolita cronică.* Editura medicală, București, 1970.
35. Frobisher M., Hinsdil R. D., Crabtree K. T., Goodhearth C. R. *Fundamentals of Microbiology.* Ed. 9. Saunders Comp. Philadelphia, 1974.
36. Fudenberg H. H., Stites D. și col. *Basic and Clinical Immunology.* Ed. 3. Lange Med. Publ. Los Altos, California, 1980.
37. Furth R. van, Cohn Z. A. *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes.* J. Exp. Med. 128, 415—421, 1968.
38. Gale E. F. *Don't talk to me about permeability.* J. Gen. Microb. 68/I, 1—4, 1971.
39. Garvey J. S. și col. *Methods in immunology.* Ed. 3. W. A. Benjamin Inc. Reading Massachusetts, 1977.
40. Gavrilă I., Pascariu C. *Septicemiile.* Editura medicală, București, 1976.
41. Gerhardt P. (Editor-in Chief) *Manual of Methods for General Bacteriology,* ASM Washington, 1981.
42. Gordon J., Minks M. A. *The interferon renaissance: molecular aspects of induction and action.* Microbiol. Rev. 45, 244—266, 1981.
43. Haddock B. A., Jones C. W. *Bacterial Respiration.* Bact. Rev. 41, 47—99, 1977.
44. Harold F. M. *Conservation and transformations of energy by bacterial membranes.* Bact. Rev. 36, 172—230, 1972.
45. Hayes W. *The genetic of bacteria and their viruses.* Ed. 2 Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1968.
46. Ivanof A. *Curs de Microbiologie,* Partea I și II. Litografia I.M.F. Cluj-Napoca 1975, 1977.
47. Ivanof A. și col. *Caiet de lucrări practice de microbiologie.* Partea I și II. Litografia I.M.F. Cluj-Napoca, 1970, 1972.
48. Ivanof A., Sașcă C., Vancea D. *Curs de Microbiologie.* Partea III. Litografia I.M.F. Cluj-Napoca, 1980.

Scanned with OKEN Scanner

49. Jawetz E. și col. *Review of Medical Microbiology.* Ed. 13. Lange Med. Publ. Los Altos, California, 1978.
50. Jawetz E. și col. *Review of Medical Microbiology.* Ed. 14. Lange Med. Publ. Los Altos, California, 1980.
51. Joklick W. K., Willett H. P. *Zinsser Microbiology.* Ed. 16. Appleton Century Crofts. New York, 1976.
52. Kiss Șt. *Microbiologie generală.* Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, 1972.
53. Klebnoff S. J. *Oxygen-dependent antimicrobial systems of the neutrophil.* Microbiology. Ed. D. Schlessinger. 87—91. ASM Washington, 1978.
54. Lennette E. H., Balows A. și col. *Manual of Clinical Microbiology.* Ed. 3. ASM Washington, 1980.
55. Lewin B. *Gene expression,* vol. 3. Plasmids and Phages. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1977.
56. Lüderitz O., Staub A. M., Westphal O. *Immunochemistry of O and R Antigens of Salmonella and related Enterobacteriaceae.* Bact. Rev. 30, 192—256, 1966.
57. Luria S. E., Darnell Jr. și col. *General Virology.* Ed. 3. John Wiley and Sons, New York, 1978.
58. Malech H. L. *Cellular aspects of neutrophil chemotaxis.* Microbiology. 188—191. Ed. D. Schlessinger, 1981.
59. Mandelstam J., McQuillen K. *Biochemistry of Bacterial Growth.* Blackwell Scient. Publ., Oxford, 1968.
60. Maniloff J.. Marowitz H. J. *Cell biology of the Mycoplasma. Bact. Rev.* 36, 263—290, 1972.
61. Mărgineanu C. *Microbiologie stomatologică.* Editura didactică și pedagogică, București, 1981.
62. Mesrobeanu I., Berceanu Șt. (sub redacție). *Imunologie, imunochimie, imunopatologie.* Editura Academiei RSR, București, 1975.
63. Mesrobeanu L., Păunescu E. *Fiziologie bacteriană.* Editura Academiei R.P.R., București, 1960.
64. Miescher P. A., Müller-Eberhardt H. J. *Textbook of Immunopathology.* Ed. 2. vol. I, Grune and Stratton New York, 1976.
65. Migne J. *Biochimie de l'inflamation.* Les systemes phlogogenes. *Biologie Medicale,* nr. 1, 11—35, 1972.
66. Mitchison N. A. *Mechanism of action of antilymphocyte serum. Fed. Proc.* 29, 222—223, 226—229, 1970.
67. Mogensen S. C. *Role of Macrophages in natural resistence to virus infections.* Microbiol. Rev. 43, 1—26, 1979.
68. Moraru I., Păunescu E. și col. *Dicționar enciclopedic de imunologie.* Editura științifică și enciclopedică, București, 1981.
69. Nestorescu N. *Bacteriologie medicală.* Editura medicală, București, 1965.
70. Nicolău S. S. (sub redacție). *Elemente de inframicrobiologie specială.* Editura medicală, București, 1962.
71. Ornston L. N., Yeh W. K. *Toward molecular natural history.* In Microbiology. Ed. D. Schlessinger. 140—143, ASM Washington, 1981.
72. Osborn M. J. *Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall.* Ann. Rev. Biochem. 38, 501—538, 1969.
73. Paina N. și col. *Curs de epidemiologie.* Litografia I.M.F. Cluj-Napoca, 1973.
74. Papilian V. V. și col. *Curs elementar de histologie.* Litografia I.M.F. Cluj-Napoca, 1982.
75. Pappenheimer J. A. M. *Interaction of protein toxins with mammalian cell*

Scanned with OKEN Scanner